

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA
DE LOS ALIMENTOS**



**VALORACIÓN DEL CONTENIDO DE SELENIO
TOTAL Y BIODISPONIBLE EN ESPECIES
PESQUERAS DE CONSUMO HABITUAL EN ESPAÑA**

TESIS DOCTORAL

JEAN RAFAEL MARVAL LEÓN

DIRECTORES:

Fernando Cámara Martos

Rafael Moreno Rojas

Córdoba, mayo de 2015

TITULO: *Valoración del contenido de selenio total y biodisponible en especies pesqueras de consumo habitual en España.*

AUTOR: *Jean Rafael Marval León*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

AGRADECIMIENTOS

Al comienzo todo fue un sueño. Para algunos, una quimera en mi mente ilusa; para mí, un reto y muchos obstáculos por superar. Gracias al Presidente Hugo Rafael Chávez Frías y a la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO) por decidir utilizar parte del excedente que otorga la renta petrolera en subvención a los estudiantes.

También agradezco a Lisdania Romero, por su ayuda con los trámites para la visa y a Eumelis Jasper por confiar en mí y financiar mi primer viaje a Europa. Ustedes dos permitieron la ignición necesaria para que el reto llegue a feliz término.

Como olvidar la confianza del Dr. Rafael Moreno Rojas para encargarme el proyecto que ahora finalizo. Gracias a él y al Dr. Fernando Cámara Martos por la paciencia que tuvieron con mi persona, espero que al final puedan sentirse satisfechos y que las decepciones no aporten efectos significativos al lado de los logros alcanzados.

Gracias a todos los miembros de la Universidad de Córdoba, y a quienes no lo son, que se encuentran vinculados a este proyecto. Gracias por estar allí para aportar una mano amiga, nombrarlos podría generar que mi memoria realice una mala jugada y termine menospreciando a quienes no nombré. Pero quien lea estas palabra y consciente se encuentre que aportó consejos, apoyo anímico y material, o simplemente me brindó un poco de tiempo o compañía; todos ustedes hoy y mañana los recordaré con un cariño especial.

Gracias a la familia y a Luis Matey. Luis, si mi hermano Ysmel viviera estaría agradecido de ti como lo estoy yo. Gracias por tratarme, en su ausencia, como a un hermano.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias una beca otorgada por parte del gobierno de la República Bolivariana de Venezuela, a través de la Fundación Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO), y al apoyo prestado por parte del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba.

En memoria de

Ysmel, Arévalo, Juana y Hugo

“Siendo muy difícil apreciar donde termina el arte y principia la ciencia, si su inclinación lo decide a aprender algún arte u oficio yo lo celebraría, pues abundan entre nosotros médicos y abogados, pero nos faltan buenos mecánicos y agricultores que son los que el país necesita para adelantar en prosperidad y bienestar”.

Simón Bolívar

[Método que se debe seguir en la educación de mi sobrino Fernando Bolívar. Lima, 1825]

ÍNDICE

| | | |
|---------|--|-----|
| I. | RESUMEN | VII |
| | ABSTRACT | IX |
| II. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| III. | OBJETIVOS | 8 |
| III.1. | OBJETIVO GENERAL | 9 |
| III.2. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 9 |
| IV. | REVISIÓN Y ANTECEDENTES | 10 |
| IV.1. | EL SELENIO | 11 |
| IV.1.1. | <i>Química del Selenio.</i> | 12 |
| IV.1.2. | <i>Selenoproteínas.</i> | 14 |
| IV.1.3. | <i>Función Biológica y Metabolismo</i> | 16 |
| IV.1.4. | <i>Deficiencia y toxicidad del selenio</i> | 18 |
| IV.1.5. | <i>Ingesta de Selenio en alimentos.</i> | 21 |
| IV.2. | ANÁLISIS DE SELENIO | 22 |
| IV.2.1. | <i>Espectrometría de Absorción Atómica</i> | 23 |
| IV.2.2. | <i>Análisis por inyección de flujo (FIA) y Generación de Hidruros (HG)</i> | 28 |
| IV.3. | BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DEL SELENIO | 29 |
| IV.3.1. | <i>Factores que Afectan la Biodisponibilidad del Selenio.</i> | 30 |
| IV.3.2. | <i>Evaluación de la biodisponibilidad del selenio.</i> | 33 |
| V. | DISEÑO Y METODOLOGÍA | 37 |
| V.1. | INSTRUMENTACIÓN | 38 |
| V.2. | ACONDICIONAMIENTO DEL TUBO DE GRAFITO CON CLORURO DE IRIDIO. 38 | |
| V.3. | DIGESTIÓN DE LA MUESTRA. | 39 |
| V.4. | MUESTRAS | 39 |
| V.5. | DETERMINACIONES DE HUMEDAD. | 40 |
| V.6. | DETERMINACIONES DE PROTEÍNA, GRASA Y CADMIO. | 40 |
| V.7. | OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ANALÍTICAS PARA FI-HG-GFAAS. 40 | |
| V.7.1. | <i>Cribado de factores</i> | 41 |
| V.7.2. | <i>Diseño de Superficie de Respuesta Compuesto Central</i> | 42 |
| V.8. | CUANTIFICACIÓN DEL SELENIO BIOACCESIBLE | 43 |
| V.8.1. | <i>Disoluciones enzimáticas y membrana de diálisis.</i> | 47 |
| V.8.2. | <i>Ensayo de diálisis.</i> | 47 |
| V.8.3. | <i>Ensayo de solubilidad.</i> | 48 |
| VI. | RESULTADOS | 49 |
| VI.1. | OPTIMIZATION OF SELENIUM DETERMINATION BASED ON THE HG-ET-AAS METHOD FOR ITS APPLICATION TO DIFFERENT FOOD MATRICES | 50 |
| VI.2. | BIOACCESSIBILITY AND CONTENT OF SE IN FISH AND SHELLFISH WIDELY CONSUMED IN MEDITERRANEAN COUNTRIES: INFLUENCE OF PROTEINS, FAT AND HEAVY METALS | 59 |
| VI.3. | SELENIUM BIOAVAILABILITY IN FOODS: THE ROLE OF SPECIATION AND INTERACTION WITH OTHER DIETARY COMPONENTS | 68 |
| VII. | CONCLUSIONES | 92 |
| VIII. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 94 |
| IX. | OTRAS PUBLICACIONES | 114 |

I. RESUMEN

El selenio es un micronutriente esencial en la alimentación humana ya que forma parte del centro activo de la glutatión peroxidasa, enzima que actúa como un potente antioxidante y ejerce un efecto protector frente a los radicales libres; encontrándose presente en alimentos tanto de origen vegetal como animal. Entre estos alimentos se encuentra el pescado y otros productos pesqueros, componentes esenciales de la dieta mediterránea, cuyo consumo ofrece un efecto beneficioso para la salud debido a su alto contenido en proteínas de gran valor nutricional, ácidos grasos ω -3, vitamina D y sustancias antioxidantes (entre ellas el selenio).

Sin embargo, la función nutricional del selenio no depende únicamente de su contenido en los alimentos, sino de otros factores tanto fisiológicos como nutricionales que pueden afectar a su biodisponibilidad. Este término puede definirse como la fracción de nutriente presente en un alimento que es digerida, absorbida y utilizada fisiológicamente por el organismo. En función de lo anterior, se planteó la necesidad de obtener datos sobre contenido total y biodisponibilidad de selenio en 20 especies pesqueras de mayor consumo en España que nos aporten información de interés sobre el valor nutricional de las mismas. Una combinación de dos técnicas analíticas como espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros (HG-AAS) y espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito (ET-AAS) en HG-ET-AAS fue optimizada para la determinación de selenio total y bioaccesible en muestras de pescado. Para la optimización de la técnica analítica se utilizó un diseño compuesto central rotacional con el objeto de evaluar el efecto de los cuatro factores analíticos más influyentes (concentraciones de HCl, NaBH₄ y NaOH; así como la velocidad de flujo de N₂) sobre la sensibilidad del método. La biodisponibilidad de selenio fue estimada en 20 especies pesqueras de alto consumo en España basándose en ensayos *in vitro* que simulaban una digestión gastrointestinal y determinando el

contenido de selenio solubilizado y dializado a través de una membrana semipermeable. Los resultados permitieron establecer la concentración de NaBH_4 como el factor analítico más influyente sobre la sensibilidad del método así como obtener límites de detección y cuantificación de $0,09 \mu\text{g/l}$ y $0,30 \mu\text{g/l}$ respectivamente; con porcentajes de recuperación conseguidos, en materiales certificados de referencia, muy cercanos al 100%. Finalmente el contenido de selenio total ($\mu\text{g/g}$ de materia seca), osciló entre $0,638 \pm 0,038$ en caballa y $0,081 \pm 0,003$ en salmón; con una fracción de selenio soluble entre 83,8% (salmón) y 43,4% (lenguado) y una fracción dializable inferior a 15% en todas las especies estudiadas. Igualmente se investigó la influencia de las proteínas las grasas y el cadmio sobre la bioaccesibilidad del selenio en pescado, no observándose ninguna correlación entre bioaccesibilidad del selenio y contenido proteico; por su parte sí se observó una correlación negativa entre el contenido de grasa y selenio bioaccesible así como se apreció que el contenido de cadmio redujo significativamente la biodisponibilidad de selenio. A través de la investigación desarrollada se generaron dos publicaciones en revistas indexadas: *Optimization of selenium determination based on the HG-ET-AAS method for its application to different food matrices* [Food Analytical Methods 10/2011; 5(5)] y *Bioaccessibility and content of se in fish and shellfish widely consumed in mediterranean countries: influence of proteins, fat and heavy metals* [International Journal of Food Sciences and Nutrition 2014; 65(6)]; así como el capítulo de un libro: *Chapter 1: Selenium bioavailability in foods: the role of speciation and interaction with other dietary components* [Morrison W. 2015. Selenium: Dietary Sources, Properties and Role in Human Health. Nova Science Publishers]. Además, se han generado las siguientes publicaciones a congresos: *Determinación de selenio total y bioaccesible en muestras de pescado mediante combinación de espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros con cámara de grafito (HG-ET-AAS)* [XXIII Reunión Nacional de Espectroscopía VII Congreso Ibérico de Espectroscopía; Córdoba, del 17-20 de Septiembre de 2012]; *Contenido de selenio en productos pesqueros ampliamente consumidos en España* [VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba del 12 al 14 de junio de 2013] y Bioaccesibilidad de selenio en productos pesqueros:

influencia de las proteínas, grasa y metales pesados [VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba del 12 al 14 de junio de 2013].

ABSTRACT

Selenium is an essential micronutrient in the human diet as part of the active center of glutathione peroxidase, an enzyme that acts as a redox catalyst and protects against free radical damage; which is a component of both plant and animal origin foods. Including fish and fishery products; essential ones in the Mediterranean diet, and which offer a beneficial effect on health due to its high protein content of high nutritional value, ω -3 fatty acids, vitamin D and antioxidants (including selenium). However, selenium nutritional function depends not only on their content in foods. Other factors exist, both physiological and nutritional, that can affect their bioavailability. This term can be defined as the fraction of a nutrient in food that is digested, absorbed and used by the body physiologically. Based on the above, the need for data on bioaccessibility and total content of Se in 20 fish and shellfish species most eaten in Spain that would provide relevant information about their nutritional value was raised. A combination of two analytical techniques such as Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS) and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ET-AAS) in HG-ET-AAS was optimized for the determination of total and bioaccessible selenium in fish samples. In the optimization of the method a rotary central composite design was used in order to evaluate the effect of the four most influential analytical factors on the sensitivity of method: NaBH_4 (in percent weight per volume), HCl (in mole per liter), NaOH (in percent weight per volume), as well as carrier flow (in milliliters per minute). The bioavailability of selenium was estimated at 20 fish species most eaten in Spain using *in vitro* assays to simulate gastrointestinal digestion and determine the content of soluble and dialyzable selenium through a dialysis membrane. The results have established the concentration of NaBH_4 as the most influential factor on the analytical sensitivity of the method and obtain limits of detection and

quantification of 0.09 µg/l and 0.30 µg/l respectively; with high recovery rates achieved in certified reference materials. Finally the content of total selenium (µg/g dry weight), ranged from 0.638 ± 0.038 in mackerel to 0.081 ± 0.003 in salmon; with a soluble selenium fraction between 83.8% (salmon) and 43.4% (sole) and a dialyzable fraction less than 15% in all species studied. Also the influence of the proteins, fats and cadmium on the bioavailability of selenium in fish was investigated. No correlation between protein content and selenium bioavailability was observed; however, a negative correlation between fat and bioavailable selenium was observed as well as the fact that the cadmium content, significantly, reduced bioavailability of selenium. This research has lead to two publications in indexed journals: *Optimization of selenium determination based on the HG-ET-AAS method for its application to different food matrices* [Food Analytical Methods 10/2011; 5(5)] and *Bioaccessibility and content of Se in fish and shellfish widely consumed in mediterranean countries: influence of proteins, fat and heavy metals* [International Journal of Food Sciences and Nutrition 2014; 65(6)]; as well as a book chapter: *Chapter 1: Selenium bioavailability in foods: the role of speciation and interaction with other dietary components* [Morrison W. 2015. Selenium: Dietary Sources, Properties and Role in Human Health. Nova Science Publishers]. The following publications have been generated for Congress: *Determinación de selenio total y bioaccesible en muestras de pescado mediante combinación de espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros con cámara de grafito (HG-ET-AAS)* [XXIII Reunión Nacional de Espectroscopía VII Congreso Ibérico de Espectroscopía; Córdoba, september 2012]; *Contenido de selenio en productos pesqueros ampliamente consumidos en España* [VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba june 2013] and *Bioaccesibilidad de selenio en productos pesqueros: influencia de las proteínas, grasa y metales pesados* [VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, june 2013].

II. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El selenio es considerado un elemento esencial para la nutrición humana debido a su papel antioxidante en colaboración con otros micronutrientes como la vitamina E, lo que hace necesario disponer de datos sobre su contenido en alimentos.

La importancia del selenio como nutriente viene definida porque forma parte del centro activo de la glutatión peroxidasa, enzima que protege a las membranas celulares de la peroxidación lipídica causada por los radicales libres. Además sustituye al azufre en determinados aminoácidos, como cisteína y metionina, debido a las similitudes químicas con este elemento, dando lugar a las selenoproteínas (Strain y Cashman, 2009). Se han identificado al menos 25 selenoproteínas con sus correspondientes isoformas en el cuerpo humano (Gromer et al., 2005). Dentro de estas glutatión peroxidasas (GP1-4), tioredoxinas reductasas (TR1-3), desiodinasas y selenoproteína P desempeñan funciones particulares importantes. Así, TRx regula el balance redox celular catalizando la reducción de compuestos oxidados y jugando un papel fundamental en la apoptosis (Gromer et al., 2005). Las desiodinasas están implicadas en la función tiroidea regulando los niveles de triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) (Tapiero et al., 2003). Selenoproteína P (SeP) es la principal selenoproteína en plasma actuando como transportadora de este elemento entre el hígado y otros órganos como cerebro, riñones y testículos (Burk et al., 2006; Hill et al., 2007).

La ingesta de selenio en la dieta resulta esencial sólo en pequeñas cantidades, con una Recommended Dietary Allowance (RDA) de 55 $\mu\text{g}/\text{día}$ para ambos sexos. Sin embargo diferentes estudios señalan que un ligero aumento de esta dosis podría producir efectos adversos sobre la salud (Aldosary et al., 2012; Reilly, 2006; Stranges et al., 2010; Yang et al., 1983); estableciéndose una “Tolerable Upper Intake Level” (UL) de 400 $\mu\text{g}/\text{día}$ en Estados Unidos (Goldhaber, 2003; Pedrero y Madrid, 2009) y de 300 $\mu\text{g}/\text{día}$ en Europa (SCF-Scientific Committee on Food, 2000).

El contenido de selenio en un alimento depende del que se encuentra presente en el suelo en el que la planta se ha cultivado o dónde el animal fue

alimentado ya que la principal fuente de selenio es la erosión y desgaste de rocas de la corteza terrestre por lo que aquellas zonas derivadas del Cretácico tendrán concentraciones más elevadas de este elemento (Presser et al., 1994). Por tanto la ingesta de selenio va a variar considerablemente a lo largo de la población mundial dependiendo de la zona de la Tierra en que nos encontremos. La esencialidad del selenio como elemento traza tanto para el hombre como para los animales ha sido ampliamente reconocida por la prevalencia de enfermedades relacionadas con su deficiencia en aquellas zonas en que su presencia en el medio ambiente es baja. De entre ellas; la enfermedad de Keshan es una cardiomiopatía endémica prevalente en niños, adolescentes y mujeres embarazadas de la región de Keshan (China) donde los niveles de selenio en suelo son extremadamente bajos (Lederer, 1986). Esto hace que, para aquellas zonas en las que exista una deficiencia de selenio en la dieta, se haya recomendado suplementos nutricionales de este elemento con el fin de aumentar su ingesta diaria (Pyrzynska, 2009).

Sin embargo, puede ocurrir que alimentos con elevados contenidos de un micronutriente, no aporten realmente al organismo, cantidades significativas del mismo debido a problemas de biodisponibilidad. Este concepto, muy utilizado en el campo de la nutrición, hace referencia a la fracción de un micronutriente originalmente presente en un alimento que es digerida, absorbida y utilizada fisiológicamente por el organismo. Junto a una serie de factores tanto fisiológicos como dietéticos, la biodisponibilidad está relacionada con la forma química en la que se encuentra el compuesto en el alimento.

En el caso del selenio las diferentes especies presentes en los alimentos [Se^{IV} , Se^{VI} , selenocisteína, selenometionina, etc.] difieren en su biodisponibilidad. De acuerdo con algunos estudios las formas orgánicas, especialmente la selenometionina, son más eficientes para elevar los niveles de selenio en sangre en comparación con las formas inorgánicas (Thomson et al., 1993; van der Torre et al., 1991; Whanger y Butler, 1988). Algunas investigaciones sobre especiación han aportado evidencias que aquellos compuestos de selenio capaces de producir formas monometiladas de selenio (por ejemplo, metilselenocisteína y el ácido metilselénico), poseen un efecto protector en la prevención de determinados tipos de cáncer mucho mayor que para otras especies (Abdulah et al., 2005).

El selenio interactúa con la vitamina E favoreciendo su función biológica (Strain y Cashman, 2009) pero su afinidad con otros elementos como telurio, plomo, cobre, zinc, cadmio, mercurio, plata y arsénico (Högberg y Alexander, 2007; House y Welch, 1989; Young et al., 1982) puede comprometer su biodisponibilidad. Dentro de éstos, metales pesados como arsénico y mercurio han sido elementos cuya interacción y antagonismo con el selenio ha sido ampliamente estudiada en investigaciones previas (Cabañero et al., 2007; Khan y Wang, 2009; Miyazaki et al., 2005; Zeng et al., 2005). Así el selenio puede convertirse en un agente capaz de reducir la toxicidad de iones metálicos como cadmio y mercurio (Nuttall y Allen, 1984) al mismo tiempo que estos metales pesados pueden reducir la biodisponibilidad de este elemento al formar compuestos insolubles (Spallholz et al., 2004).

En los últimos años se han efectuado diversos estudios destinados al desarrollo y optimización de métodos para la cuantificación y especiación de selenio en alimentos, dentro de los cuales podemos destacar la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (Lavilla et al., 2007), espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (Hegedus et al., 2008) y espectrometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros (Ventura et al., 2009).

La espectrometría de absorción atómica con horno de grafito por generación de hidruros (HG-GFAAS) se basa en que el selenio puede formar fácilmente hidruros volátiles con hidrógeno, utilizando principalmente borohidruro sódico. Antes de la generación del hidruro es necesario un proceso de digestión y de reducción previa en condiciones ácidas para convertir todo el Se^{VI} a Se^{IV} que es la forma en la cual el selenio puede formar hidruros. Una vez que se ha formado, el hidruro puede ser conducido fuera de la solución y transportado por un gas inerte como argón o más frecuentemente nitrógeno hacia el tubo de grafito donde el selenio es fijado. Por calentamiento electrotérmico del tubo de grafito el selenio es atomizado, excitado y medido mediante un detector al igual que ocurre con la espectrometría de absorción atómica (ET – AAS). Una variante de la técnica anterior es aquella en la que la excitación del hidruro de selenio se produce por una fuente fluorescente de luz dando lugar a la espectrometría de absorción atómica por fluorescencia.

En un estudio realizado para la determinación de selenio en vegetales; comparando las técnicas espectrofotométricas de generación de hidruros, cámara de grafito mediante efecto Zeeman y cámara de grafito con corrección mediante lámpara de deuterio se encontró que esta última es incapaz de distinguir entre blanco y muestras con un bajo contenido en selenio (Hegedus et al., 2008). De las dos primeras, aplicables a muestras con bajo contenido en selenio, la que presentó mejores límites de cuantificación y detección fue la generación de hidruros lo que sugiere la posibilidad de utilizarla como técnica para determinar selenio en aquellas muestras en que su concentración es baja.

Un alimento con un contenido en selenio relativamente alto y componente esencial de la dieta mediterránea es el pescado. En 2009, el pescado representó el 16,6 % del aporte de proteína animal de la población mundial y el 6,5% del total de proteínas consumidas (FAO, 2012). Según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), en España, el consumo per cápita de este tipo de productos alcanzó en el año 2013 los 27,19 kg (MAGRAMA, 2015). Este consumo de pescado es especialmente beneficioso para la salud debido a su alto contenido en proteínas de gran valor nutricional,

ácidos grasos ω -3, vitamina D y minerales antioxidantes como el selenio.

Sin embargo, aunque el contenido de selenio en pescado y otras especies marinas es elevado, se ha reportado una baja fracción del selenio total que resulta realmente bioaccesible (Moreda-Piñeiro et al., 2013a). Igualmente, algunas especies pueden acumular iones minerales, pudiendo llegar a registrar niveles potencialmente tóxicos de selenio y mercurio como consecuencia de su presencia natural o como resultado de la contaminación (Plessi et al., 2001).

En cuanto a los estudios enfocados a determinar la biodisponibilidad del selenio, existen diferentes tipos de técnicas, clasificándose en dos grandes grupos: métodos *in vivo* (Fox et al., 2004; Koyama et al., 2007) y métodos *in vitro* (Hur et al., 2011; Moreda-Piñeiro et al., 2013a). Para distinguirlos se utiliza el concepto

de bioaccesibilidad para la estudios *in vitro* reservándose la biodisponibilidad para los *in vivo*. Estos estudios *in vitro* son más utilizados por su simplicidad, rapidez y buena correlación con estudios *in vivo*. Básicamente se fundamentan en reproducir en un matraz de laboratorio un proceso de digestión similar al que tiene lugar en el aparato digestivo humano y determinar la fracción de mineral que se encuentra soluble (solubilidad) o que dializa a través de una membrana semipermeable (diálisis). Ambos métodos se fundamentan en el principio de que para que un elemento pueda ser absorbido, la primera condición que ha de cumplir es encontrarse solubilizado en el lumen intestinal (Cámara et al., 2005). La similitud de los modelos anteriores al comportamiento *in vivo* se puede mejorar con la incorporación de una línea celular Caco-2.

En función de lo anterior, es necesario disponer de datos sobre contenido total y bioaccesibilidad de selenio en alimentos, que nos aporten información de interés sobre el valor nutricional de los mismos, intentando aplicar estos resultados al desarrollo de estudios de ingesta dietética en población y a la formulación de productos alimentarios con un mayor valor añadido.

La presente Tesis Doctoral se ha enfocado en optimizar un método de determinación de selenio mediante combinación de las técnicas de espectrometría de absorción atómica en horno de grafito y generación de hidruros en una matriz alimentaria. El método optimizado se ha empleado a su vez para la cuantificación del contenido de selenio total y bioaccesible en las principales especies de pescado consumidas en España, estudiando los principales factores que afectan a su biodisponibilidad. Finalmente el trabajo se completa con una revisión bibliográfica en forma de capítulo de libro sobre los diferentes factores que afectan a la biodisponibilidad de este elemento.

III. OBJETIVOS

III.1. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar el contenido de selenio total y bioaccesible en las principales especies pesqueras y de acuicultura consumidas en España, estudiando los principales factores que afectan a su biodisponibilidad.

III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar un método analítico, espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito mediante generación de hidruros (HG – ET – AAS), que permita cuantificar los niveles de selenio total y bioaccesible en diferentes matrices alimentarias (productos pesqueros).
- Desarrollar estudios in vitro de bioaccesibilidad de selenio (ensayos de solubilidad y diálisis) en las principales especies pesqueras y de acuicultura consumidas en España
- Correlacionar la concentración de selenio total y bioaccesible en estas especies pesqueras y de acuicultura con su contenido en proteínas, grasa y metales pesados.

IV. REVISIÓN Y ANTECEDENTES

IV.1. EL SELENIO

Identificado en 1818 por Jöns Jakob Berzelius, el selenio, reconocido bajo el símbolo químico Se, es un elemento no metálico ubicado en el grupo 16 de la tabla periódica junto con el oxígeno, azufre, telurio y polonio. Cuando Berzelius obtiene por primera vez el elemento lo confunde con el telurio cuyo nombre deriva del latín *tellus* (tierra) por lo que decide llamar al nuevo elemento selenio, del vocablo griego *Selene* (diosa luna), y que hace alusión a nuestro satélite. Como la luna, el selenio presenta dos caras: la cara iluminada de su rol como elemento traza esencial para el humano y la cara oscura por ser un poderoso tóxico, convirtiéndose así en un veneno.

El selenio se halla en los minerales de sulfuros metálicos y su principal fuente es el refinamiento electrolítico del cobre (Shriver y Atkins, 1999). A lo largo de la historia se han descrito síntomas de toxicidad en animales y personas que vivían en áreas en las que el suelo era rico en selenio (Casals Mercadal et al., 2005; Coultate, 1997); mucho tiempo antes que se supiera, en los años '50, que era también un nutriente esencial en el metabolismo de algunos microorganismos (Pinsent, 1954) y mamíferos (Schwarz y Foltz, 1957).

Se distribuye ampliamente en todo el entorno; los procesos responsables de su distribución incluyen actividad volcánica, la quema de combustibles fósiles, la erosión de las rocas y de los suelos, el transporte a través de aguas subterráneas, la precipitación de minerales, la adsorción, reducción y oxidación química o bacteriana, así como la absorción y liberación metabólica por plantas y animales (McNeal y Balistrieri, 1989). La mayoría de los estudios sugieren que la deposición atmosférica es una fuente importante de contaminación por selenio, estimándose que entre 37,5% y 40,6% de las emisiones de selenio total a la atmósfera se deben a actividades antropogénicas (Wen y Carignan, 2007), sobre todo por la combustión de carbón y petróleo, fundición de metales no ferrosos y por su utilización en productos agrícolas. Además de sus implicaciones en la nutrición humana, se usa como pigmento en la coloración del vidrio (Morales Güeto, 2005), en la producción de celdas solares y aplicaciones electrónicas debido a sus propiedades fotovoltaicas y fotoconductoras (Shriver y Atkins,

1999), en rectificadores para convertir corriente alterna en corriente continua, vulcanización del caucho y sus derivados, así como en el desarrollo de champús para el control de la caspa (House y House, 2010).

IV.1.1. Química del Selenio.

El selenio tiene una estructura electrónica $[\text{Ar}] 3d^{10} 4p^4 4s^2$ y puede formar enlaces con diferentes grados de oxidación $[\text{Se}^{-\text{II}}, \text{Se}^{\text{IV}} \text{ y } \text{Se}^{\text{VI}}]$, siendo Se^{VI} el más frecuente en soluciones acuosas. Las propiedades químicas del selenio son similares a las del azufre, pudiendo combinarse directamente con la mayoría de los elementos (Shriver y Atkins, 1999).

IV.1.1.1. Selenio inorgánico.

En su estado de oxidación más bajo ($\text{Se}^{-\text{II}}$) forma hidruro de selenio (H_2Se), un gas tóxico y maloliente que puede prepararse lentamente mediante la combinación directa de los elementos o aumentando la velocidad de reacción mediante la adición de borohidruro de sodio; siendo esta reacción en la que se fundamenta la espectrometría de absorción atómica mediante generación de hidruros. En esta forma también puede reaccionar con metales para originar compuestos iónicos como el seleniuro de sodio (Na_2Se); pero también puede formar compuestos covalentes con otros elementos (Reilly, 2006).

El selenio se oxida lentamente al aire produciendo dióxido de selenio (SeO_2), pero a temperaturas elevadas el elemento arde liberándose rápidamente SeO_2 el cual es un agente altamente oxidante que se disuelve en agua para formar ácido selenioso (H_2SeO_3). Por su parte, el trióxido de selenio (SeO_3) se obtiene mezclando oxígeno con el vapor de SeO_2 y pasando la mezcla a través de un ozonizador. El SeO_3 se disuelve en agua para formar ácido selénico (H_2SeO_4). Las sales de estos dos ácidos (selenitos $[\text{SeO}_3^{-2}]$ y selenatos $[\text{SeO}_4^{-2}]$) son de gran importancia como suplementos dietéticos y fertilizantes.

La distribución del selenio en el ambiente está íntimamente ligada a su especiación, que es regulada por el pH y las condiciones redox del medio. Cada estado de oxidación muestra un comportamiento químico diferente. En la naturaleza, seleniuros metálicos, sulfuro de selenio y selenio elemental (Se^0) son

insolubles y, por lo tanto, biológicamente indisponibles. Para el pH y las condiciones oxidantes de la mayor parte del suelo y las aguas, SeO_3^{-2} y SeO_4^{-2} , son las formas dominantes de selenio. El ión selenito es inmovilizado por adsorción sobre las partículas, especialmente oxihidróxido de hierro; el ión selenato es móvil y biológicamente disponible debido a la solubilidad de sus sales y su débil adsorción por las partículas (McNeal y Balistrieri, 1989).

IV.1.1.2. Selenio orgánico

El ciclo biogeoquímico del selenio es análogo al ciclo del azufre, en él existen organismos que reducen el elemento de la forma más oxidada y otros organismos que completan el ciclo mediante la oxidación del elemento reducido a su estado inicial (Shrift, 1964). Así, la acción microbiana puede cambiar la forma química del selenio a través de la oxidación o reducción, o mediante la formación de compuestos orgánicos (McNeal y Balistrieri, 1989). La conversión de selenio por microorganismos del suelo a dimetilselenuro volátil (DMSe) puede considerarse como una forma de detoxificación de los suelos (Stork et al., 1999).

Las formas en las que el selenio se presenta en los organismos vivos y los sistemas en los que se encuentra biológicamente disponible para los mismos depende de la cantidad y formas en que se le provee, así como de la especie viviente que lo asimila (Baran, 1991). Las especies orgánicas más conocidas son selenometionina (SeMet), selenocisteína (SeCys) y las formas metiladas de estos últimos: metilselenocisteína (MeSeCys) y metilselenometionina (MeSeMet); SeMet y SeCys son análogos de los aminoácidos azufrados metionina (Met) y cisteína (Cys) con un átomo de selenio reemplazando el átomo de azufre (Johansson et al., 2005).

Por lo general, la mayoría de las especies de selenio presentan una alta absorción (70 – 95%) (Finley, 2006), aunque las fuentes orgánicas de este elemento parecen ser más biodisponibles que las fuentes inorgánicas (Le y Fotedar, 2014). También, bajo condiciones fisiológicas, los mecanismos de absorción y metabolismo de las diferentes especies son completamente diferentes (Gammelgaard et al., 2012).

IV.1.2. Selenoproteínas.

Dentro de las formas orgánicas del selenio, la selenocisteína, considerada por algunos autores como el 21 aminoácido, es componente de al menos 30 selenoproteínas, algunas de las cuales tienen funciones enzimáticas importantes. Así, la selenocisteína se ubica generalmente en el sitio activo de enzimas como la glutatión peroxidasa (Strain y Cashman, 2009). Otras funciones de las selenoproteínas están relacionadas con la homeostasis de la hormona tiroidea, la inmunidad y la fertilidad, así como otras aún no completamente clarificadas (Reilly, 2006).

De las selenoproteínas identificadas en mamíferos, las más caracterizadas son varias isoformas de la glutatión peroxidasa, tres iodotironinas deiodinasas y tres tioredoxinas reductasas (Reilly, 2006).

IV.1.2.1. Glutatión peroxidasa

Desde el punto de vista químico el glutatión es el compuesto de bajo peso molecular con grupo sulfhidrilo (-SH) más importante en plantas y animales. Se trata de un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys) (Martínez Sarrasague et al., 2006).

La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxidos (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH). En este proceso el GSH se convierte en su forma oxidada, disulfuro de glutatión (GSSH), que es reducida nuevamente a GSH por acción de la enzima glutatión reductasa (Cisneros Prego, 1995). Existen, al menos, 4 formas de GPx seleno dependientes que varían en su localización celular y en el gen que las codifica: una forma intracelular, citosólica o celular (GPx-c), una gastrointestinal (GPx-gi), una extracelular o plasmática (GPx-p), y otra con actividad específica para los hidroperóxidos de ácidos grasos esterificados en los fosfolípidos (GPx-ph) que por lo general está asociada a la membrana y aunque su actividad es la misma, poseen diferencias estructurales (Cisneros Prego et al., 1997; Reilly, 2006). Las isoenzimas GPx, representan alrededor del 36% de selenio total del cuerpo (Strain y Cashman, 2009).

IV.1.2.2. Tiorredoxina Reductasa

La tiorredoxina es una pequeña, multifuncional y ubicua proteína; caracterizada por tener un sitio activo redox (ditiol/disulfuro) que posee la secuencia -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-. La tiorredoxina puede existir en su forma oxidada (Trx-S_2), con un enlace disulfuro; o en su forma reducida [Trx-(SH)_2], con un enlace ditiol (Holmgren y Björnstedt, 1995). La tiorredoxina está presente en la mayoría de los organismos (Arnér y Holmgren, 2000), y en su forma Trx-(SH)_2 es un reductor celular que participa en una serie de reacciones celulares tiol-dependientes tales como síntesis enzimática de ADN, defensa contra el estrés oxidativo, regulación redox de la expresión génica, o transducción de la señal por el control redox de los grupos tioles (Holmgren, 1989; Nakamura et al., 1997).

La tiorredoxina reductasa (TR) de los mamíferos es una selenoproteína diméricas, homólogas a la glutatión reductasa, con la secuencia terminal -Gly-Cys-SeCys-Gly (Zhong et al., 2000). Presenta tres isoformas: tiorredoxina reductasa 1 o citosólica (TR1), tiorredoxina reductasa 2 o mitocondrial (TR2) y tiorredoxina reductada 3 (TR3) (Reilly, 2006).

IV.1.2.3. Yodotironina Deiodinasa

Las yodotironinas deiodinasas son selenoenzimas que juegan un papel fisiológico importante en el cuerpo catalizando la activación e inactivación de las hormonas tiroideas (TH), responsables de la regulación de varios procesos metabólicos (Reilly, 2006).

Cuando los niveles de yodo en la dieta son adecuados, el producto principal de la glándula tiroides es la tiroxina que se secreta a una velocidad 10 veces superior a la de 3,5,3'-triyodotironina (T3) en los seres humanos. Se cree que la tiroxina (T4) es una prohormona y un depósito para la hormona principal y más activa T3. La T4 es convertida según sea necesario en los tejidos por la yodotironina deiodinasa (Larsen y Zavacki, 2012). Esta enzima cataliza la eliminación secuencial y estereoespecífica de átomos de yodo de la pro-hormona T4, generando isómeros activos e inactivos tanto de T3 como de diyodotironina (T2). Esta biotransformación se produce prácticamente en todos los tejidos del

organismo y es catalizada por tres isotipos de deiodinasas: DI1, DI2, y DI3, cada una con diferentes propiedades catalíticas, tejidos específicos y expresiones de desarrollo (Orozco et al., 2012).

Las yodotironinas deiodinasas tipo 1 y 2 (DI1 y DI2) catalizan la conversión de T4 en su forma activa T3 por desyodación del anillo exterior (Köhrle, 2002). La inactivación por vía de la desyodación del anillo interior es catalizada principalmente por DI3 (Orozco et al., 2012).

Los tres tipos de deiodinasas descritos se diferencian por el tejido en que se ubican y su función. La DI1 es la más abundante y se encuentra fundamentalmente en el hígado y en el riñón, también en la glándula tiroidea y en el tejido muscular; su principal función es proveer de T3 a los tejidos. La DI2 se expresa en el cerebro y la hipófisis, mantiene constante los niveles de T3 en el sistema nervioso central. Finalmente, la DI3 también se expresa en el cerebro, además de la placenta y tejidos fetales (Balada Nicolau, 2012).

IV.1.3. Función Biológica y Metabolismo

La función biológica del selenio se conoce a partir de los estudios de Pinsent (1954) en cepas de *Escherichia coli* y el carácter acerca de su esencialidad en mamíferos, por parte de Schwarz y Foltz (1957). Por aquel entonces, Pinsent demostró la esencialidad de trazas de selenito y molibdato para la síntesis de enzima fórmico deshidrogenasa por cepas de organismos coliformes; aunque ni selenito ni molibdato tenían influencia sobre el crecimiento celular. Schwarz y Foltz (1957), por su parte, publicaron el artículo "*Selenium as an integral part of factor 3 against dietary liver degeneration*", donde se estudió el efecto de la administración de selenio en ratas con necrosis hepática por déficit de vitamina E. Los resultados mostraron que el selenio tiene una función antioxidante, debido a la reducción de la necrosis hepática en dichas ratas. Sin embargo, no fue hasta dos décadas después cuando Rotruck et al (1973) identificaron la función reductora de la especie selenocisteína como parte del centro activo de la enzima glutatión peroxidasa (Rotruck et al., 1973). A partir de ese momento son muchos los ensayos que se han efectuado para identificar las funciones fisiológicas y bioquímicas de este elemento.

La función del selenio como antioxidante presenta una considerable sinergia con las funciones de la vitamina E. La vitamina E reduce los radicales lipoperóxidos a ácidos grasos no reactivos; la enzima glutatión peroxidasa, dependiente de selenio, reduce el peróxido de hidrógeno a agua, reduciendo así la concentración intracelular de esta molécula y el potencial daño oxidativo. Glutatión peroxidasa también reducirá los radicales tocoferoxilo a tocoferol. Por lo tanto, la vitamina E actúa eliminando los productos de la peroxidación lipídica, mientras que el selenio actúa tanto eliminando las causas de la peroxidación lipídica como reciclando la vitamina E (Bender, 2009).

En forma de selenoproteínas, hay evidencias de que selenio puede conferir beneficios en pacientes con enfermedad inflamatoria e incluso enfermedades infecciosas como el VIH. También, en pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, la suplementación con selenio puede mejorar los resultados clínicos (Duntas, 2009).

Como ya se ha comentado, las selenoproteínas GPx y Trx-(SH)₂ están involucradas en la protección del daño oxidativo de la glándula tiroidea debido al exceso de peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno producida por los folículos durante la biosíntesis de las hormonas tiroideas. Igualmente, existen tres selenoenzimas claves implicadas en la activación e inactivación de las hormonas tiroideas (DI1, DI2 y DI3). De este modo se ha encontrado que la deficiencia de selenio, en combinación con una deficiencia en yodo, contribuye a la patogénesis de cretinismo mixedematoso (Köhrle y Gärtner, 2009). Por otra parte, el selenio, parece tener un efecto protector en las diversas etapas de la carcinogénesis incluyendo tanto las etapas tempranas como las tardías de la progresión de un cáncer (Zeng y Combs, 2008).

El selenio estimula el sistema inmunológico actuando contra el efecto inmunosupresor de metales pesados como cadmio (El-Boshy et al., 2015) y mercurio (Li et al., 2014). Se necesita selenio para el buen funcionamiento de los neutrófilos, macrófagos, células NK, linfocitos T y algunos otros mecanismos inmunes (Ferenčík y Ebringer, 2003).

El selenio también desempeña un rol crítico en el funcionamiento del sistema nervioso, demostrándose que niveles bajo de este elemento conlleva a una deficiencia en la protección contra lesiones neuronales causadas por desórdenes

cerebrales como epilepsia y derrame cerebral; lesiones que han sido mitigadas con el suministro de niveles más altos de selenio (Bräuer y Savaskan, 2004; Savaskan et al., 2003). Igualmente su deficiencia puede originar complicaciones gestacionales, abortos involuntarios y daños en los sistemas nervioso e inmunológico del feto; así como también puede causar infertilidad en los hombres por causa de un deterioro en la calidad del semen y en la motilidad del espermatozoides (Ahsan et al., 2014; Pieczyńska y Grajeta, 2015).

IV.1.4. Deficiencia y toxicidad del selenio

El selenio es un nutriente esencial para muchos organismos, incluyendo algunas arqueas, bacterias, protozoos y algas verdes (Van Hoewyk, 2013), pero también es un tóxico a partir de una determinada dosis. Mientras que ciertas algas requieren selenio para la síntesis de selenoproteínas, no se ha demostrado que las plantas superiores lo requieran. Algunas plantas pueden incluso hiperacumular selenio a niveles de alrededor de 1% de su peso seco, en la forma de metilselenocisteína; probablemente como mecanismo de detoxificación (Pilon-Smits y Quinn, 2010).

La toxicidad de selenio en plantas se ha atribuido a la formación de selenoproteínas no específicas. Sin embargo, este paradigma puede ser cuestionado ahora que hay cada vez mayores evidencias que apuntan al estrés oxidativo inducido por selenio como causa de la toxicidad de este elemento en plantas. A pesar de todo, los cultivos suministran la mayor parte del selenio de la dieta en seres humanos (Van Hoewyk, 2013) y pueden ser utilizados tanto para proveer las cantidades requeridas de selenio en áreas con deficiencias de este elemento, como para eliminar la contaminación en zonas seleníferas (Pilon-Smits y Quinn, 2010).

En animales de granja, en especial animales jóvenes, la deficiencia de selenio contribuye a patologías como la distrofia muscular nutricional o enfermedad del músculo blanco en corderos, cabritos, potros, terneros y aves de corral hasta los 3 meses de edad. De igual forma, dietas deficientes en selenio también puede causar diátesis exudativa en aves de corral, necrosis hepática y la enfermedad del corazón de mora en cerdos, así como problemas en el parto, aumento de la mortalidad embrionaria, retención placentaria e inflamaciones

purulentas del revestimiento uterino. En contraste, el envenenamiento por selenio rara vez sucede en animales de granja, y casi siempre resulta de una sobredosis de suplementos de selenio. Las formas más comunes de selenosis son la selenosis crónica, conocida como “enfermedad alcalina”, y la selenosis aguda, conocida popularmente como “desequilibrio ciego” (Żarczyńska et al., 2013).

Los primeros en observar en animales síntomas de intoxicación encontraron que a menudo esto se producía cuando los rebaños se alimentaban en determinadas zonas donde el suelo era alcalino. Ellos creían que ciertas plantas que allí crecían tomaron la alcalinidad de la tierra y como resultado los rebaños desarrollaron la "enfermedad alcalina"; otro nombre que utilizaron fue "desequilibrio ciego", que describe los pasos vacilantes de su ganado (Reilly, 2006).

El desequilibrio ciego es una forma aguda de intoxicación que ocurre tras un periodo breve (desde días a pocas semanas) de ingesta diaria muy elevada de selenio por parte del animal y se caracteriza por alteraciones de la visión, pérdida del apetito y deambulación en círculos. Si no se detiene la elevada ingesta de selenio, puede producirse una progresiva parálisis de la lengua y del mecanismo de deglución y, finalmente, acaba en la muerte por depresión respiratoria. La intoxicación crónica o enfermedad alcalina, se asocia con concentraciones menos elevadas de selenio pero mantenidas a lo largo del tiempo (muchas veces tarda varios años en aparecer). Se caracteriza por pérdida de pelo, deformación y desprendimiento de las pezuñas y erosión con pérdida de vitalidad en las articulaciones de los huesos largos (Casals Mercadal et al., 2005).

En humanos, se han diagnosticado dos enfermedades por deficiencia endémica severa de selenio: una miocardiopatía juvenil (enfermedad de Keshan), y una osteoarticular (enfermedad Kaschin-Beck). Cada una se ha observado en zonas rurales de China y Rusia (Siberia oriental) donde los niveles de selenio en suelo son bajos. No obstante es probable que la deficiencia de selenio pueda ser también un factor en la concurrencia de otras enfermedades causadas por ARN-virus (por ejemplo, sarampión, influenza, hepatitis y SIDA) (Combs, 2001).

La enfermedad de Keshan es una miocardiopatía endémica diagnosticada por primera vez en la República Popular de China, que se presenta con mayor frecuencia en niños menores de 15 años de edad y mujeres en edad fértil. La

principal característica patológica es una miocarditis multifocal, repartida por todo el músculo cardíaco con diferentes grados de infiltración celular y diversas fases de fibrosis. Clínicamente, se puede dividir en cuatro tipos: subaguda, aguda, crónica y latente. Con exclusión de la de tipo latente, los casos de mortalidad son altos. Estudios realizados durante la década de los 70 demostraron que una ingesta oral de selenito de sodio (0,5 – 1,0 mg) podía reducir la probabilidad de concurrencia de esta enfermedad asociada al bajo contenido de selenio en cereales y en el cabello en residentes de las zonas afectadas. Sin embargo, aunque existía una relación entre dosis de selenio y las características regionales de la enfermedad de Keshan, se sugerían otros factores etiológicos como causantes de la misma (Chen et al., 1980). Hoy en día, se conoce que esta miocardiopatía juvenil está asociada a una doble etiología que implica tanto una deficiencia nutricional de selenio, como una infección por una cepa miocárdica del enterovirus coxsackie (Beck et al., 2003; Jun et al., 2011). La letalidad en China, de la enfermedad de Keshan, fue superior al 80% en la década de 1940, pero ha disminuido en los últimos años a menos de 30%, aparentemente como resultado de una mejor atención médica (Combs, 2001).

Por su parte, la enfermedad de Kashin-Beck es una osteoartropatía crónica y degenerativa (Cao et al., 2008), que es endémica en El Tibet y otras zonas de China, Siberia y Corea del Norte y que generalmente se manifiesta entre los 5 - 15 años (Moreno-Reyes et al., 1998). Aunque la etiología de la enfermedad no se conoce y la deficiencia de selenio no es su causa real, se sabe que dicha deficiencia es un importante factor de riesgo ambiental. Al proporcionar selenio a la población en cantidades apropiadas, y especialmente a los niños, la enfermedad se puede controlar y evitar eficazmente (Zhao et al., 2013).

En relación a la toxicidad de selenio, sólo se ha notificado algunos casos de exposición humana a niveles peligrosos de este elemento. La mayoría de ellos debido a inhalación de selenio por exposición ocupacional (Combs, 2001). Sin embargo, una enfermedad endémica causada por la intoxicación con selenio a través del consumo de alimentos fue descubierta en 1961 en una zona de China y cuya morbilidad fue casi del 50% en los años de mayor prevalencia. El signo más común de esta intoxicación fue la pérdida del cabello y las uñas (Yang et al., 1983). Otros síntomas de intoxicación por selenio incluyen vómitos, diarrea,

lesiones en la piel y del sistema nervioso, así como aliento con olor a ajo (Reilly, 2006). Existen determinadas zonas seleníferas donde se han reportado problemas por intoxicación con selenio; por ejemplo, los niños de determinadas zonas de Venezuela pueden llegar a consumir con la lactancia materna 10 veces más selenio que los niños de Finlandia (Jaffé, 1992).

Como ya ha sido comentado, conjuntamente con su función para proteger el organismo del estrés oxidativo y sobre el metabolismo de las hormonas tiroideas, la ingesta de selenio se ha asociado a la prevención de enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares (Rees et al., 2013), hipertensión (Xun et al., 2011) así como diversos tipos de cáncer (Wu et al., 2006; Zeng y Combs, 2008). También se han aportado pruebas que asocian una ingesta adecuada de selenio frente a la protección contra el daño neuronal causado por lesiones cerebrales excitotóxicas (Bräuer y Savaskan, 2004; Savaskan et al., 2003). No obstante, aunque los estudios que hasta la fecha se han realizado no muestran el efecto preventivo de los suplementos de selenio, existe en cambio la posibilidad de que aumente el riesgo de padecer diabetes tipo 2, hiperlipidemia, alopecia y dermatitis (Rees et al., 2013; Stranges et al., 2010).

IV.1.5. Ingesta de Selenio en alimentos

El selenio fue reconocido como elemento esencial para la nutrición humana en 1973 e incorporado en 1989 como nutriente con un valor de ingesta dietética recomendada (Spallholz et al., 2004). De esa forma, el Instituto de Medicina de los Estados Unidos ha establecido para el selenio un RDA (*Recommended Dietary Allowance*) de 55 µg/día y un UL (*Tolerable Upper Intake Level*) de 400 µg de Se/día (Institute of Medicine - Food and Nutrition Board, 2000). Se considera la RDA como los niveles de ingesta a los cuales, en base a conocimientos científicos, el riesgo de deficiencia por la población es muy bajo (2 – 3 %) y la UL como la ingesta para la cual el riesgo de padecer toxicidad por exceso está cercano a cero. Para su consideración, a la hora de reflejar en el etiquetado el aporte nutricional de un determinado alimento, la FDA (*Food and Drug Administration*) ha establecido como RDI (*Reference Daily Intake*) para el selenio 70 µg/día (FDA, 1995)

Aunque un mismo producto puede presentar contenidos muy distintos de selenio, según el suelo donde se haya cultivado (Coultate, 1997); en la mayoría de las dietas, las fuentes de alimentación dominantes de selenio son los cereales, carnes y pescados. Los productos lácteos y los huevos aportan pequeñas cantidades de este elemento para las ingestas totales de la mayoría de los países, pero pueden representar un alto porcentaje del total de la ingesta en los países donde su consumo es relativamente grande y/o cuando el resto de la dieta proporciona poco selenio. Las frutas y hortalizas aportan poco selenio a la dieta (< 8% de la ingesta total) (Combs, 2001). En cambio, los frutos secos son generalmente muy ricos en selenio, sobre todo las nueces de Brasil donde se han detectado tasas de 53 mg de Se / kg (Coultate, 1997).

La situación dietética del selenio es afectada por su interacción con otros elementos metálicos. La ingesta de selenio generalmente se realiza en forma de mezcla con otros metales, metaloides y sus compuestos; por lo tanto es importante tener en cuenta la acción conjunta de estos elementos tanto en términos de los mecanismos de acción como de efectos en evaluación de riesgos. La acción conjunta de estos elementos puede producir efectos aditivo, sinérgico, antagónico y/o potenciador que pueden manifestarse bajo las formas de toxicidad directa celular (necrosis o apoptosis) o carcinogenicidad (Nordberg et al., 2007).

IV.2. ANÁLISIS DE SELENIO

Para la determinación del contenido total de selenio existen diversas técnicas analíticas que incluyen métodos espectroscópicos, electroquímicos y radioquímicos (Hegedus et al., 2008); utilizándose comúnmente la espectroscopía, dentro de la cual se incluye la espectroscopía atómica y la molecular

Para la cuantificación de selenio total mediante espectroscopía atómica (espectrometría de absorción atómica, de emisión atómica, de fluorescencia o de masas), el elemento presente en la muestra debe ser convertido en átomos gaseosos o iones elementales mediante un proceso llamado atomización; midiéndose entonces la radiación absorbida de una determinada longitud de onda, la radiación emitida, la fluorescencia o la relación masa-carga de las especies

atómicas presentes en el vapor. Por su parte, la espectrometría de absorción molecular Uv/Vis se basa en la determinación de la transmitancia o absorbancia de soluciones depositadas en celdas transparentes (Skoog et al., 2008).

En los métodos espectrométricos resulta primordial obtener espectros ópticos o de masa atómicos, para lo cual los constituyentes de la muestra deben ser convertidos en átomos o iones gaseosos que puedan ser determinados por mediciones espectrales de emisión, absorción, fluorescencia o masa. La exactitud y la precisión de los resultados dependerán en gran medida del proceso de atomización y del método de introducción de muestra seleccionado. Los instrumentos usados para la atomización de la muestra incluyen sistemas continuos de atomización (llama y plasma) y atomizadores discretos (cámara de grafito). En cualquier caso, la muestra es introducida generalmente en soluciones acuosas; sin embargo, para muestras que son difíciles de disolver, se han utilizado métodos para introducir las en el atomizador de forma directa aunque este método de introducción directa es menos reproducible y está sujeto a varios errores (Skoog et al., 2008).

Para aumentar la sensibilidad y reducir las interferencias de los métodos espectrométricos se han desarrollado sistemas de introducción de la muestra como la inyección de flujo (FI) (Cabon y Erler, 1998; Carrero y Tyson, 1998; Näykki et al., 2001) o el sistema de atomización mediante plasma acoplado inductivamente (ICP - OES) (Díaz Huerta et al., 2003; Wang et al., 2007). Por otra parte, si el interés está en determinar las especies químicas del selenio, se han desarrollado técnicas separativas como la cromatografía de gases (GC) (Campillo et al., 2007; Gómez-Ariza et al., 1998), la cromatografía líquida (LC) (Gómez et al., 1998) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Kozak et al., 2012; Raessler et al., 2000).

IV.2.1. Espectrometría de Absorción Atómica

La espectrometría de absorción atómica (AAS) está fundamentada en la capacidad de un átomo para absorber una determinada longitud de onda específica del espectro electromagnético. Así, el interés de la AAS está en determinar la cantidad de energía de una determinada longitud de onda que es absorbida cuando un rayo de luz incide sobre una nube de átomos. Esta cantidad de energía

absorbida aumenta de manera proporcional a medida que el número de átomos aumenta, por ello, mediante la medición de la cantidad de luz absorbida se puede determinar la cantidad de analito presente en la muestra.

El uso de fuentes de luz especiales y una cuidadosa selección de la longitud de onda permite la determinación cuantitativa de un elemento específico, aun en presencia de otros. La nube de átomos en estado fundamental capaces de absorber la longitud de onda determinada se obtiene a partir del suministro de la energía térmica necesaria para disociar los compuestos químicos en átomos libres. La facilidad y velocidad con que se obtienen mediciones precisas y exactas ha hecho de esta técnica uno de los métodos más populares para la detección de elementos metálicos (Beatty y Kerber, 1993).

Existen dos métodos principales para la atomización de la muestra para el análisis de AAS: la espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS) y la espectrometría de absorción atómica por calentamiento electrotérmico o por cámara de grafito (ET-AAS o GF-AAS).

El método por llama utiliza diferentes mezclas de gases para generar llamas con altas temperaturas de atomización, requiriéndose diferentes tipos de llamas en función del elemento a analizar. La muestra, en forma líquida, se aspira directamente a la llama y, debido a la relativa baja capacidad de atomización, el método puede no ser lo suficientemente sensible como para medir la mayoría de los elementos presentes en muestras biológicas. En el horno de grafito, la temperatura de atomización alcanza aproximadamente 2000 °C, aumentando en varios órdenes de magnitud el número de átomos y, por lo tanto, la sensibilidad de detección. Una pequeña alícuota de la muestra se inyecta directamente a la cámara de grafito, siendo en algunos casos necesario un modificador de matriz para favorecer la eliminación de otros componentes de la muestra y reducir las interferencias durante la atomización (Cornelis y Nordberg, 2007).

IV.2.1.1. Atomización de la muestra en cámara de grafito

La atomización de la muestra en la cámara de grafito ocurre dentro de un tubo cilíndrico que está abierto por ambos extremos y que tiene un orificio central para la inyección de la muestra. Dos tipos de tubos de grafito son los más utilizados, atomizadores de grafito por calentamiento longitudinal (LHGA) y

atomizadores de grafito con calentamiento transversal (THGA). Este último provee mejores condiciones isotérmicas durante la atomización, lo que se traduce en reducción de las interferencias, mejora de la repetitividad y reduce los límites de detección. Sin embargo, la pequeña longitud de los THGA (18 mm) en comparación con los LHGA (28 mm) reduce la sensibilidad en términos de masa característica. La adición de tapas en los extremos de los tubos THGA (EC-THGA) ha permitido aumentar la sensibilidad, reproducibilidad y límites de detección. Aun así, para la determinación de los elementos refractarios el uso de tubos THGA estándar es más apropiado debido a que se logra una velocidad de calentamiento más rápido sin las tapas en los extremos (Hoenig y Dheere, 1995).

Una pequeña parte integral del THGA está conformada por la plataforma L'Vov, que permite alcanzar un mayor equilibrio térmico y reducir las interferencias. Cuando no se utiliza la plataforma, la muestra se deposita sobre la pared en la parte central del tubo; esta región es la parte que se calienta más rápido y alcanza primero la temperatura de atomización. Es decir, que el analito se volatiliza en la región donde está más alta la temperatura pero como la atmósfera que le rodea no está a la misma temperatura, el enfriamiento repentino inhibe la atomización. La plataforma L'Vov, en cambio, está construida con grafito pirolítico de baja conductividad térmica y se calienta por radiación desde las paredes del tubo; lo que retrasa la atomización de la muestra hasta que el tubo de grafito y la atmósfera que le rodea alcancen el equilibrio térmico (Villegas Casares et al., 1998).

Una atmósfera inerte durante la atomización de la muestra es un requisito en cualquier análisis con horno de grafito. Un flujo de gas inerte externo previene la degradación que el oxígeno ambiental causaría sobre las paredes externas del tubo cuando se expone a altas temperaturas. Además de permitir aumentar la vida del tubo, arrastra los vapores generados por la muestra en las fases previas a la atomización (Villegas Casares et al., 1998).

IV.2.1.2. Corrección de fondo y efecto Zeeman

Durante la atomización de la muestra se origina una señal de fondo debida a la absorción, emisión, o dispersión producida por todo lo que hay en la muestra,

distinto al analito (la matriz); así como por la absorción, emisión o dispersión producida por la llama, plasma u horno.

El efecto de la matriz durante la atomización puede reducirse agregando un modificador químico, el cual puede actuar incrementando la volatilidad de la matriz o disminuyendo la volatilidad del analito (Villegas Casares et al., 1998). El modificador de matriz puede ser añadido a la muestra en solución (Rodríguez García et al., 2005) o fijado térmicamente a la plataforma L'Vov del tubo de grafito como recubrimiento permanente (Grinberg y de Campos, 2001). Paladio, Nitrato de Magnesio, y Níquel (da Silva et al., 2013) así como dihidrógeno fosfato de amonio (Rodríguez García et al., 2005) se utilizan como modificadores añadidos a la muestra; como modificador permanente sobre la plataforma L'vov pueden utilizarse iridio (Shaltout et al., 2011), tungsteno (Silva et al., 2011) y otros elementos de alto punto de ebullición o que formen compuestos refractarios como paladio, rodio, platino, rutenio, titanio, tantalio, wolframio, entre otros (Tsalev et al., 2000).

La utilización de modificadores de matriz puede ayudar a reducir la señal de fondo y aumentar la sensibilidad al reducir la volatilización del analito. Sin embargo, no eliminan totalmente las interferencias. Los métodos más utilizados para corregir la dispersión y la absorción de fondo son la lámpara de deuterio y el sistema de corrección Zeeman.

La corrección de fondo mediante lámpara de deuterio consiste en hacer pasar la emisión de banda ancha procedente de una lámpara de deuterio a través de la nube atómica que produce la atomización de la muestra, alternando con la lámpara de línea espectral reducida correspondiente al analito que se desea medir. La diferencia entre la absorbancia de la lámpara de línea espectral seleccionada menos la absorbancia de la señal proveniente de la lámpara de deuterio representa la absorbancia debida al analito (Harris, 2006).

Por otro lado, cuando un vapor atómico se expone a un campo magnético fuerte tiene lugar una división de líneas de absorción o emisión de los átomos en tres o más componentes. El patrón de división más sencillo origina una línea central (π) y dos líneas desplazadas simétricamente de la línea central ($-\sigma$ y $+\sigma$) (ver figura 1). La línea π absorbe solo la radiación que se polariza en el plano en una dirección paralela al campo magnético; las líneas $-\sigma$ y $+\sigma$ en contraste

absorben solo radiación polarizada a 90° respecto al campo (Skoog et al., 2008). Este fenómeno es llamado efecto Zeeman y solo afecta los espectros atómicos, la absorción debida al fondo no es usualmente afectada por el campo magnético (Harris, 2006).

Generalmente se usan dos métodos que aplican corrección Zeeman:

- Corrección Zeeman transversal, donde el campo magnético y el haz de luz que emite la lámpara del espectrómetro se encuentran a 90° uno del otro.
- Corrección Zeeman longitudinal, donde el campo magnético y el haz de luz que emite la lámpara del espectrómetro se encuentran en paralelo.

Aplicando el efecto intermitente de un campo magnético alrededor del atomizador se pueden obtener entonces mediciones de la absorbancia con y sin aplicación de dicho campo. Debido a que durante la aplicación del campo magnético, solo la absorción debido al fondo es medida, si se resta ésta a la medida de la absorbancia cuando el campo magnético no es aplicado, se tendrá la medición de la absorbancia debida al analito en estudio. Su ventaja sobre otros métodos se basa en que la medición del fondo se realiza en la misma línea espectral del analito en lugar de otra longitud de onda más amplia (Butcher, 1995).

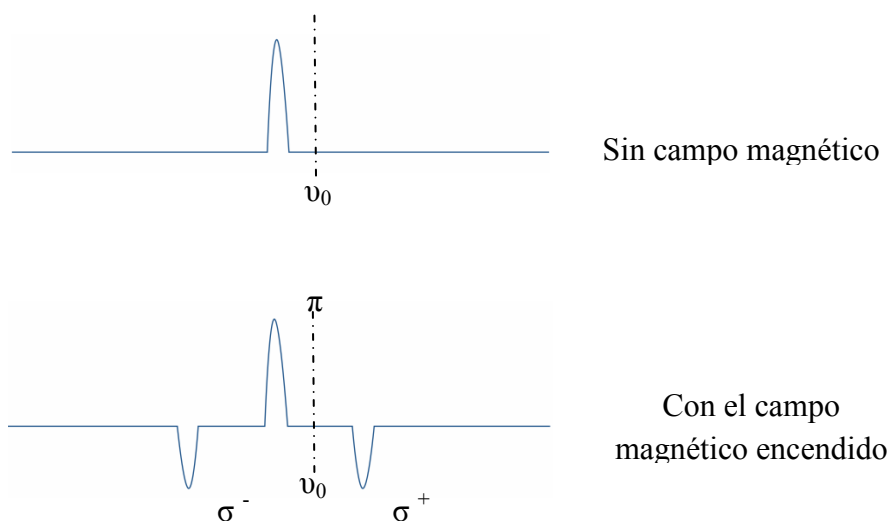


Figura 1. Efecto Zeeman. Tomado de Beaty y Kerber (1993).

IV.2.2. Análisis por inyección de flujo (FIA) y Generación de Hidruros (HG)

El análisis por inyección de flujo (FIA) se basa en inyectar una muestra a una corriente de líquido en movimiento que contiene los reactivos (Harris, 2006). Al cabo de un tiempo adecuado, durante el que reacciona la muestra, el analito puede ser introducido y nebulizado en un atomizador de llama, horno de grafito o inyectado en cualquier otro sistema detector.

En el desarrollo de métodos analíticos donde alguna técnica de espectrometría atómica se utilice para la cuantificación, a menudo es necesario evitar que cualquiera de los componentes de la matriz interfiera con la medición del analito. Las técnicas de análisis por inyección en flujo pueden ayudar a reducir estas interferencias mediante pre-tratamientos químicos, remoción de la matriz y/o pre-concentración del analito. Es así como en el análisis cuantitativo las técnicas FIA's tiene diversas aplicaciones como la adición de reactivos a la muestra, extracción en fase-sólida (SPE), generación de vapor (VG), extracción líquido-líquido (LLE), precipitación y/o diálisis (Tyson, 1999).

La inyección de flujo por generación de vapor (FI-VG) aplicado a la AAS se basa en la generación de un derivado químico volátil de la especie analizada, la extracción de este derivado químico volátil de la solución mediante un dispositivo separador de fases gas-líquido y su transporte al atomizador (Tyson, 1999). La combinación del FIA con la espectrometría de absorción atómica por generación de vapor (VG-AAS) ha logrado mejorar significativamente la sensibilidad y selectividad de esta última (Fang et al., 1996).

FI-VG incluye las técnicas de generación de hidruros (HG) y Vapor frío (CV). La HG acoplada a la AAS es uno de los métodos empleados para la determinación de cantidades trazas de arsénico, selenio, bismuto, antimonio y otros elementos capaces de formar hidruros covalentes volátiles; por su parte la técnica de CV-AAS se aplica en la cuantificación de mercurio. Tanto la HG-AAS como la CV-AAS presentan una alta sensibilidad relativa en comparación con las técnicas de FAAS y ETAAS (Fang, 1995).

En la HG, los hidruros volátiles se generan al añadir a una solución acuosa acidificada de la muestra, un pequeño volumen de solución acuosa con un agente reductor, como el borohidruro de sodio o tetrahidrobórato de sodio (NaBH_4). El

hidruro volátil, entonces se separa de la fase líquida y se transfiere al sistema detector mediante un gas inerte transportador (nitrógeno o argón).

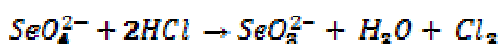
La generación del hidruro se efectúa usualmente en una solución de ácido clorhídrico de baja molaridad. En presencia de ácido clorhídrico la mayoría del tetrahidrobtorato es hidrolizado produciendo la liberación de hidrógeno (Tamari, 1998):



La reacción, en presencia de selenio en forma de selenito, puede definirse con la siguiente ecuación:



Las especies de selenito pueden ser reducidas a seleniuro de hidrógeno, las especies de selenato en cambio no son reducidas. Para la cuantificación del selenio total, debe realizarse una reducción previa del selenato a selenito en ácido clorhídrico; dependiendo la reducción de la siguiente reacción:



IV.3. BIOACCESIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DEL SELENIO

Es bien conocido que la concentración de nutrientes en un alimento no necesariamente es un indicador fiable del valor de ese alimento como fuente del nutriente en cuestión. En este sentido, a la hora de evaluar la cantidad de nutrientes que aporta un alimento, es necesario tener en cuenta su biodisponibilidad.

La biodisponibilidad de un nutriente puede implicar varias conceptualizaciones y restricciones del término, dependiendo del autor. Algunos estiman la biodisponibilidad en función de modelos in vitro que midan la eficiencia en la absorción desde el lumen intestinal hacia la sangre (Moreda-

Piñeiro et al., 2013b); sin embargo, los nutrientes absorbidos pueden estar en una forma no utilizable, por lo que puede considerarse la biodisponibilidad como aquella proporción de nutriente en el alimento ingerido que resulta asequible para su utilización en los procesos metabólicos (Fennema, 2000).

Para una mejor comprensión de la biodisponibilidad mineral, se hace una diferenciación entre los términos: bioaccesibilidad, biodisponibilidad y bioactividad. Siendo la fracción bioaccesible, aquella que es soluble en el intestino y que se encuentra disponible para los procesos subsiguientes de absorción a través de la mucosa intestinal; la fracción biodisponible del elemento será aquella que se absorbe y alcanza el sistema circulatorio con el fin de ser distribuida en órganos y tejidos; y la parte bioactiva corresponde a la fracción que es convertida en metabolitos biológicamente activos (Thiry et al., 2012).

Uno de los factores más determinantes en la biodisponibilidad mineral es la solubilidad del elemento en el intestino delgado, ya que los compuestos insolubles no pueden ser absorbidos. En este sentido muchos de los factores potenciadores e inhibidores operan a través de la solubilización del mineral (Fennema, 2000).

IV.3.1. Factores que Afectan la Biodisponibilidad del Selenio.

Son muchos los factores que interactúan para determinar la biodisponibilidad final de un nutriente. De acuerdo al nutriente de que se trate, el grado de absorción y biodisponibilidad variará en función de los mecanismos que posea el organismo para incorporarlos. Podemos distinguir tres tipos de factores que afectan la biodisponibilidad de un micronutriente: dietéticos, fisiológicos e individuales (Moreno 2013).

IV.3.1.1. Factores dietéticos.

Forma química y solubilidad.

La identificación y cuantificación de las especies elementales, es crucial en la comprensión del metabolismo de un elemento y su importancia en biología, toxicología, química clínica y nutrición (Dumont et al 2006). En este sentido, la forma química y especiación de selenio tiene un efecto significativo sobre su

biodisponibilidad. Aunque tanto las formas orgánicas como inorgánicas son altamente absorbibles, se ha demostrado que selenometionina es más efectiva que selenato en relación a la elevación del contenido de selenio en sangre; sin embargo ambas son capaces de elevar la actividad de la glutatión peroxidasa en tejidos sanguíneos en sujetos con bajo estatus de selenio. Esto sugiere que selenometionina pueda utilizarse como una reserva de selenio en el organismo al ser incorporada en lugar de la metionina en tejidos tales como el músculo esquelético, los eritrocitos y la albúmina plasmática, contribuyendo así a una mayor biodisponibilidad a largo plazo (Levander et al 1983, Thomson et al 1993, Rayman et al 2008). Sin embargo, ciertas formas de selenio pueden no ser disponibles para la producción de glutatión peroxidasa, incluso depositándose en determinados tejidos. Por ejemplo, el selenio de atún enlatado aumentó el contenido de selenio hepático en ratas, pero no correspondientemente aumentó la actividad de glutatión peroxidasa hepática (Alexander et al 1983).

Por otra parte, aunque la absorción de los compuestos orgánicos de selenio en los alimentos parece ser buena; puede variar en función de la digestibilidad de las diversas proteínas que lo contienen. Por ejemplo, selenometionina puede acumularse en forma almacén proteico como un mimético de la metionina por lo que, el selenio, es consecuentemente bien retenido; sin embargo, no puede ser utilizado para la síntesis de selenoproteínas sin primero ser catabolizado a seleniuro de hidrógeno (H_2Se) a través de su conversión previa en selenocisteína. En contraste, selenocisteína no se almacena sino que se cataboliza directamente para formar H_2Se y está, por lo tanto, más disponible para la síntesis de selenoproteínas aunque menos retenida por los tejidos. H_2Se , independiente de su origen, puede ser utilizado para su incorporación en selenoproteínas o bien ser metilado a formas que se excretan fácilmente.

Interacciones dietéticas.

La biodisponibilidad del selenio puede estar afectada por su interacción con metales pesados y otros elementos minerales (Nordberg et al., 2007; Nuttall y Allen, 1984), vitamina E (Strain y Cashman, 2009), forma química (Gammelgaard et al., 2012) y el procesamiento de los alimentos (Moreda-Piñeiro et al., 2011). Se encuentra que elementos como As, Cu, Zn, Cd, Sn, Pb, Ni, Co, Sb, Hg, Bi, Ag,

Au, y Mo pueden inhibir los efectos anti-cancerígenos de selenio (Zeng et al., 2005).

La interacción entre mercurio y selenio es uno de los ejemplos más conocidos de antagonismo biológico, sin embargo, el mecanismo subyacente sigue siendo poco claro (Khan y Wang, 2009). Con el fin de proporcionar evidencias sobre cómo actúan estos mecanismos, se ha encontrado un efecto preventivo de la selenometionina contra el aumento de especies reactivas al oxígeno inducidas por metilmercurio (Kaur et al., 2009). Otros estudios han demostrado que las dietas enriquecidas con selenio no sólo previenen la toxicidad de metilmercurio, sino que también pueden revertir rápidamente algunos de sus síntomas más graves (Ralston y Raymond, 2010).

Otra interacción extensivamente estudiada es la que respecta a la interacción selenio-arsénico, donde los mecanismos propuestos incluyen el aumento de la excreción biliar y la directa interacción/precipitación de selenio y arsénico (Zeng et al., 2005). De esta forma, la incorporación de arsénico en la dieta animal ha sido conocida como un método para contrarrestar la toxicidad de ambos elementos en animales desde 1930. Por tanto, los altos niveles de ingestión crónica de arsénico acelerarán la eliminación de selenio y disminuirá el contenido en el cuerpo de este oligoelemento esencial (Spallholz et al., 2004).

Por otra parte, el selenio tiene el potencial de contrarrestar el efecto inmunosupresor del cadmio, así como el daño oxidativo hepático y renal inducido por este metal en ratas. Se han demostrado efectos prometedores del selenio contra la toxicidad del cadmio (El-Boshy et al., 2015).

A pesar de que el contenido de selenio en pescado y otras especies marinas es alto, se ha observado una baja bioaccesibilidad (Moreda-Piñeiro et al., 2013b). Ésta se ve afectada por factores como contenido de mercurio, proteínas, grasa y fibra (Moreda-Piñeiro et al., 2013b ; Cabañero et al., 2007; Khan y Wang, 2009).

IV.3.1.2. Factores fisiológicos.

Estatus Nutricional.

El estatus nutricional del selenio también influye sobre la biodisponibilidad de las diferentes formas químicas. De esta manera, en

individuos con un bajo contenido de selenio tanto las formas orgánicas como las inorgánicas estarán disponibles para la actividad biológica. Sin embargo, individuos con un estatus normal del mineral solo podrán disponer de aquellas especies que puedan ser almacenadas en los tejidos para su posterior metabolización en formas biológicamente activas (Levander et al., 1983).

Embarazo y lactancia.

Existen determinadas situaciones y etapas de la vida en que los requerimientos de selenio se ven aumentados. Así, las necesidades de nutrientes son mayores durante el embarazo y lactancia para apoyar el crecimiento del feto y la síntesis de leche, respectivamente. Por tanto, los cambios fisiológicos para satisfacer esas necesidades alteran la biodisponibilidad. La absorción de selenio es bastante elevada (~ 80% de la ingesta), tanto en mujeres embarazadas como no embarazadas; sin embargo las mujeres embarazadas retienen más selenio reduciendo la excreción urinaria del mismo (King, 2001).

IV.3.2. Evaluación de la biodisponibilidad del selenio.

Las técnicas empleadas para medir la biodisponibilidad de un nutriente pueden ser divididas en métodos *in vivo* y métodos *in vitro*.

IV.3.2.1. Métodos *in vivo*.

Los métodos *in vivo* pueden realizarse mediante ensayos con animales de experimentación o directamente en seres humanos. La multiplicidad de técnicas que emplean estos métodos van desde los estudios clásicos basados en balances químicos a técnicas que involucran isótopos estables o radioactivos (Valencia et al., 2013). Los estudios en animales deben ser interpretados con cautela debido a la variabilidad de especies y sus diferencias con la fisiología humana. Por otra parte las dificultades éticas para la obtención de tejidos humanos limitan la mayoría de los estudios *in vivo* con personas a la evaluación de los componentes de la sangre y a un reducido número de individuos (Daniels, 1996).

Método de los balances.

Como la medida directa de la fracción absorbida de un nutriente resulta difícil, su digestibilidad se establece de forma indirecta a través de la fracción de los componentes alimentarios no absorbidos contenidos en la excreta fecal. En este caso debe discriminarse entre la eliminación de origen alimentario (excreta exógena) y la que tiene su origen en el funcionamiento interno del organismo (excreta endógena). Para evaluar la retención y utilización metabólica, el estudio se realiza simultáneamente sobre la excreta fecal y la excreta urinaria, una alta excreta urinaria indica una baja utilización metabólica del nutriente en cuestión (Adrian et al., 2000). Aunque estos tipos de estudios son relativamente simples, errores en la determinación de la ingesta o excreción pueden dar lugar a errores significativos (Van Campen y Glahn, 1999).

Con el objeto de reducir estos errores, se han introducido métodos que emplean radioisótopos del elemento a analizar, lo que nos permite realizar estimaciones de la excreción endógena al suministrar dos isótopos radioactivos de un mismo elemento, uno por vía oral y otro por vía parenteral, siendo estas determinaciones no afectadas por la contaminación (Barberá y Farre, 1992). Así, la estimación de la absorción mineral a partir de un alimento puede realizarse marcándolo con un elemento radioactivo ya sea de manera intrínseca o extrínseca (Ammerman, 1995; House y Welch, 1989). No obstante el uso de este tipo de estudios queda principalmente limitado a modelos animales no pudiendo utilizarse en humanos y mucho menos en determinadas poblaciones como mujeres embarazadas y niños. Como consecuencia de esto, el uso de técnicas que involucran radioisótopos están siendo desaconsejadas (Valencia et al., 2013) por lo que se han ido sustituyendo por la utilización de isótopos estables (Fox et al., 2004; Van Dael et al., 2004).

Captación en tejidos o indicadores indirectos.

Las técnicas de balance pueden ofrecer buena información sobre la fracción del mineral que es absorbida; pero, en el caso del selenio, cambios de su contenido en sangre o su facultad para inducir la actividad de la glutatión peroxidasa son los métodos más comunes para medir su biodisponibilidad

(Rayman et al., 2008; Thomson et al., 1993). Suponiendo que el selenio en forma de glutatión peroxidasa está en equilibrio con los depósitos metabólicamente activos de selenio en los tejidos, la actividad de esta enzima parece el índice más válido de selenio fisiológicamente disponible. Sin embargo, este ensayo no mide el selenio depositado en formas inactivas que también se deben mensurar para una evaluación completa de la disponibilidad nutricional. No obstante, como ya se mencionó anteriormente algunas de estas formas inactivas, no están disponibles para las funciones biológicas del organismo. Por tanto, se ha sugerido utilizar tres criterios separados para medir la biodisponibilidad *in vivo* (Levander et al., 1983):

1. La actividad de la GPx en plaquetas que determine la cantidad de selenio en los alimentos que está disponible a corto plazo para la síntesis enzimática;
2. Nivel de selenio en plasma que permita determinar la retención del selenio para su utilización a medio plazo; y
3. La actividad de GPx en plaquetas, en periodo de depleción, con el fin de determinar la capacidad que tiene el selenio depositado en los tejidos para mantener la actividad enzimática.

Aun así, este protocolo no toma en consideración factores fisiológicos como el estatus nutricional de los individuos.

IV.3.2.2. Métodos *in vitro*.

Los modelos de digestión *in vitro* se utilizan ampliamente para estudiar la digestibilidad y la liberación de componentes de los alimentos en condiciones gastrointestinales simuladas. Sin embargo, los resultados de los modelos de digestión *in vitro* son a menudo diferentes a los encontrados en el uso de modelos *in vivo* debido a las dificultades en simular con precisión los complejos acontecimientos fisiológicos que ocurren en el tracto digestivo de animales y humanos. Las enzimas incluidas dentro de un modelo de digestión *in vitro* tienden a reflejar los componentes principales de alimentos que se investigan; por ejemplo: lipasas, proteasas y amilasas para la digestión de lípidos, proteínas y almidón, respectivamente; (Hur et al., 2011). Como ya se ha comentado reservaremos el concepto de bioaccesibilidad para referirnos a la biodisponibilidad mineral determinada mediante este tipo de técnicas.

Métodos basados en la solubilidad/dializabilidad

Estos métodos están fundamentados en reproducir en condiciones de laboratorio un proceso de digestión similar al que tiene lugar en el aparato digestivo humano y determinar la fracción de mineral que se encuentra soluble (solubilidad) o que dializa a través de una membrana semipermeable (diálisis). El principio en el que se sustentan es que para que un elemento pueda ser absorbido, la primera condición que ha de cumplir es encontrarse solubilizado en el lumen intestinal (Cámara et al., 2005). La diferencia entre ambos tipos de métodos es que los basados en la dializabilidad nos permite distinguir entre compuestos solubles de alto y bajo peso molecular (Cámara et al., 2005)

Los mismos involucran condiciones similares a las encontradas en el organismo humano durante la digestión (temperatura, pH, actividad enzimática y composición química) y proporcionan buenas aproximaciones a los métodos in vivo, ofreciendo ventajas en cuanto a simplicidad, rapidez, bajo costo, reproducibilidad y precisión de los resultados (Moreda-Piñeiro et al., 2011).

Métodos basados en cultivos celulares

La similitud de los modelos anteriores al comportamiento in vivo se puede mejorar con la incorporación de una línea celular de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) para determinar la fracción de compuesto capaz de ser retenido o transportado a través de soportes sólidos o microporosos (Moreda-Piñeiro et al., 2011; Pick et al., 2013; Zeng et al., 2008).

V. DISEÑO Y METODOLOGÍA

V.1. INSTRUMENTACIÓN.

Las determinaciones analíticas para la cuantificación de selenio total y bioaccesible en las especies pesqueras analizadas, se realizaron utilizando un espectrómetro de absorción atómica con cámara de grafito y corrección de fondo mediante efecto Zeeman longitudinal (Perkin Elmer, modelo AA 600), acoplado a un sistema de generación de hidruros (Perkin Elmer, modelo FIAS 400) y automuestreador; todos controlados por el software WinLab 32. Se utilizó como fuente de radiación una lámpara de descarga sin electrodos con una longitud de onda de 196 nm para el selenio

V.2. ACONDICIONAMIENTO DEL TUBO DE GRAFITO CON CLORURO DE IRIDIO.

El Iridio, como modificador permanente, permite alargar la vida media del tubo de grafito y reduce la volatilidad del selenio en las fases previas a la atomización; siempre y cuando la limpieza no sobrepase los 2300°C. El procedimiento empleado para el revestimiento del tubo de grafito con iridio fue el indicado por el fabricante. Mediante este procedimiento, la plataforma L'vov integrada al tubo de grafito fue recubierta mediante inyección de 90 µl de cloruro de iridio (1000 mg/l) en cuatro repeticiones sucesivas. Cada inyección fue secada siguiendo las condiciones mostradas en la tabla 1.

Tabla 1. Programa de secado para recubrimiento del tubo de grafito.

| Etapa | Temperatura (°C) | Rampa (s) | Meseta (s) | Flujo de argón (ml/min) |
|-------|------------------|-----------|------------|-------------------------|
| 1 | 110 | 1 | 50 | 250 |
| 2 | 130 | 30 | 50 | 250 |
| 3 | 1200 | 20 | 30 | 250 |
| 4 | 2000 | 1 | 5 | 0 |

V.3. DIGESTIÓN DE LA MUESTRA.

Para la mineralización 0,5 g de muestra liofilizada fue digerida con una mezcla de 3 ml HNO_3 y 0,5 ml de H_2O_2 utilizando un programa de digestión por microondas (CEM – MDS – 2000) garantizando la eliminación de la materia orgánica (tabla 2). Con el fin de reducir el Se^{VI} a Se^{IV} , se realizó una pre-reducción añadiendo a la muestra digerida 3 ml de HCl y calentando en el microondas a 126 W durante dos minutos. Por último, se dejó enfriar y diluyó con agua destilada desionizada hasta 25 ml.

Tabla 2. Programa de digestión de las muestras liofilizadas por microondas.

| Etapa | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| Potencia (%) | 40 | 100 | 80 | 0 |
| Presión (psi) | 60 | 100 | 120 | 20 |
| Tiempo (min) | 4 | 6 | 25 | 16 |
| TAP* (min) | 3 | 5 | 22 | 15 |
| Ventilación (%) | 100 | 100 | 100 | 100 |

* Tiempo a la presión indicada.

V.4. MUESTRAS.

Un total de 20 especies marinas ampliamente consumidas en España fueron adquiridas, en diferentes supermercados y centros comerciales de la ciudad de Córdoba durante los meses de diciembre de 2011 y marzo de 2012. Con el propósito de obtener muestras representativas, cada una de las especies analizadas fue adquirida en 6 puntos de ventas distintos, en diferentes momentos a lo largo del periodo señalado para un total de 360 muestras (18 por cada especie). Las muestras fueron transportadas refrigeradas al laboratorio. Una vez allí, la parte no

comestible fue descartada y la comestible lavada con agua destilada desionizada (DDW) con el fin de eliminar la sangre y otras impurezas. Finalmente, las muestras se trocearon, liofilizaron, molieron y envasaron en frascos de polipropileno y congelaron a -18°C hasta su posterior procesamiento y análisis.

V.5. DETERMINACIONES DE HUMEDAD.

El contenido de humedad entre las muestras frescas y liofilizadas se determinó por diferencia de peso antes y después del proceso de liofilización. La humedad de las muestras liofilizadas se determinó mediante el método de desecación en estufa ($105 \pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta peso constante.

V.6. DETERMINACIONES DE PROTEÍNA, GRASA Y CADMIO.

Para la determinación del contenido en grasa y proteínas se siguieron los métodos oficiales de análisis descritos por la AOAC; determinándose la grasa cruda mediante extracciones sucesivas con éter de petróleo en un equipo de extracción Soxhlet y la proteína bruta mediante el método micro-Kjeldahl.

Las determinaciones de cadmio se realizaron por espectrometría de absorción atómica en cámara de grafito (GF-AAS) utilizando un espectrómetro de absorción atómica con cámara de grafito y corrección de fondo mediante efecto Zeeman longitudinal (Perkin Elmer, modelo AA 600), equipado con un automuestreador (AS-800); todos controlados por el software WinLab 32.

V.7. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES ANALÍTICAS PARA FI-HG-GFAAS.

Son diversos los parámetros o factores que pueden influenciar la determinación de selenio, estos factores incluyen entre otros, la manipulación y tratamiento de la muestra, las condiciones intrínsecas del material analizado, los medios instrumentales que se utilicen, la cantidad y calidad de los reactivos involucrados y las condiciones ambientales.

La identificación y optimización de los factores que influyen en un determinado proceso de análisis puede realizarse por un método univariante; que consiste en fijar todas las variables del sistema, a excepción de una, en unos valores de partida basados en los conocimientos previos del investigador o en base a la intuición. El efecto de cada variable se va estudiando independientemente de las otras hasta lograr un resultado óptimo para cada una. La gran cantidad de experimentos a realizar, que consumen tiempo y dinero, son los principales inconvenientes de este tipo de optimización, así como la suposición de que las variables del sistema son independientes, lo que puede conducir a errores en la búsqueda del óptimo resultado

Otra forma de optimización es mediante un diseño de experimentos multifactorial, los cuales son más eficientes que los experimentos de un solo factor, ya que permite determinar las interacciones entre las diversas variables y evita llegar a estimaciones incorrectas. Estos diseños estiman los efectos de un factor con varios niveles de los factores restantes, produciendo conclusiones que son válidas para un amplio rango de condiciones experimentales (Montgomery, 2005). Sin embargo, el diseño de experimentos no es una técnica de optimización en sí mismo. Es más bien una forma de elección de las muestras en el espacio de diseño con el fin de obtener la máxima cantidad de información utilizando la cantidad mínima de recursos, es decir, con un menor número de muestras (Cavazzuti, 2012).

V.7.1. Cribado de factores

En el análisis de selenio por FI-HG-GFAAS, el número de factores que pueden influenciar la respuesta del analito son numerosos. En este sentido, para optimizar el rendimiento de dicha técnica hay que considerar el proceso de digestión y pre reducción de la muestra, la concentración de NaBH_4 y de HCl , el flujo de gas inerte, las interferencias de otros elementos, la captura y atomización del selenio en el tubo de grafito, entre otros factores (Shaltout et al., 2011; Türker y Erol, 2009).

Si se considera cuatro o más factores influyentes, con dos niveles para cada factor, el esfuerzo para realizar un diseño factorial completo podría ser

excesivo. En ese caso, los diseños de cribado permiten identificar o descartar aquellos factores que merecen una mayor investigación (Barrentine, 1999). El ahorro en cantidad de experimentos que provee estos diseños, en comparación con el diseño factorial completo, se ilustra en la tabla 3.

Tabla 3. Comparación en el número de experimentos entre un diseño factorial completo y un diseño de cribado considerando dos niveles para cada factor.

| Nº de Factores | Factorial Completo | Mínimo Diseño de Cribado |
|----------------|--------------------|--------------------------|
| 4 | $2^4 = 16$ | 8 |
| 5 | $2^5 = 32$ | 8 |
| 6 | $2^6 = 64$ | 8 |
| 7 | $2^7 = 128$ | 8 |
| 8 | $2^8 = 256$ | 16 |
| 16 | $2^{16} = 65536$ | 32 |

V.7.2. Diseño de Superficie de Respuesta Compuesto Central

Una vez identificados los factores que más influyen en la medida de rendimiento o la característica de calidad, se emplea la metodología de Superficie de Respuesta (RSM) para la optimización del método o proceso instrumental. La RSM utiliza la experimentación para lograr principalmente tres objetivos:

- Encontrar un modelo capaz de explicar la relación existente entre ciertas respuestas y determinados factores en una región de interés.
- Localizar las condiciones óptimas de los factores de experimentación para las respuestas.
- Realizar un estudio geométrico de la relación existente entre las respuestas y los factores en la región óptima, por medio del análisis canónico del modelo estimado (Prat Bartés et al., 1997).

Los diferentes tipos de diseño compuesto central (CCD) son usualmente utilizados para ciertos problemas de superficie de respuestas. En un CCD los niveles para cada factor cuantitativo son codificados como -1 (para el nivel menor) y 1 (para el nivel más alto), dos niveles axiales ($-\alpha$ y α) ubicados a ambos lados en los ejes de cada factor, y un nivel 0 que corresponde al punto medio entre

los niveles -1 y 1. Si todos los factores son cuantitativos; el punto central es el punto donde a todos los factores le corresponde el nivel 0 y un punto axial es donde a un factor le corresponde el nivel $-\alpha$ o α y al resto el nivel 0, con $\alpha > 1$. El CCD estará compuesto entonces por el factorial 2^k para los niveles -1 y 1, varios puntos centrales y todos los puntos axiales para los niveles de $-\alpha$ y α (Hedayat et al., 1999). El valor α se selecciona para lograr ortogonalidad o rotabilidad (Gonzalez et al., 2006).

En la optimización de las condiciones analíticas para la determinación de selenio total en diferentes matrices alimentarias, se utilizó un diseño compuesto central rotacional con cuatro factores analíticos a optimizar: concentraciones de HCl (factor A), NaBH₄ (factor B) y NaOH (factor C); así como la velocidad de flujo de N₂ (factor D). Dicho diseño estuvo compuesto por el factorial 24 para los niveles -1 y 1, seis puntos centrales y ocho puntos axiales para los niveles de $-\alpha$ y α (Tabla 4). Se utilizó el programa Statgraphic (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, V.A, USA) tanto para el diseño experimental como para la interpretación de los datos.

V.8. CUANTIFICACIÓN DEL SELENIO BIOACCESIBLE

Para la determinación de la bioaccesibilidad de selenio seleccionamos 20 muestras de productos pesqueros ampliamente consumidos en España. Sobre cada una de estas muestras se realizó una digestión gastrointestinal simulada compuesta de una etapa gástrica (pepsina+HCl) durante 2 horas y una etapa intestinal (pancreatina + sales biliares+NaHCO₃) durante 2 horas más. Terminado este proceso de digestión se determinó la fracción de Se soluble presente en el sobrenadante tras someter el digerido a un proceso de centrifugación a 3500 g, 4°C durante 1 hora (fracción soluble) ó la fracción de selenio que dializa a través de una membrana semipermeable con un determinado tamaño de poro (12000 A) introduciendo previamente dicha membrana en el digerido durante la etapa intestinal (fracción dializable). La determinación del contenido en selenio soluble y dializable se llevó a cabo mediante la técnica combinada de espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros con cámara de grafito

(HG-ET-AAS).

Tabla 4. Diseño compuesto central rotatable para la optimización de las condiciones analíticas en la determinación de selenio por HG-GFAAS.

| Experimentos | Factores | | | |
|--------------|----------|------|------|-----|
| | A | B | C | D |
| 1 | 0,4 | 0,35 | 0,35 | 6,0 |
| 2 | 2,0 | 0,05 | 0,35 | 6,0 |
| 3 | 2,8 | 0,5 | 0,5 | 4,5 |
| 4 | 2,0 | 0,35 | 0,35 | 6,0 |
| 5 | 1,2 | 0,2 | 0,5 | 7,5 |
| 6 | 1,2 | 0,2 | 0,5 | 4,5 |
| 7 | 2,8 | 0,2 | 0,2 | 7,5 |
| 8 | 2,0 | 0,35 | 0,65 | 6,0 |
| 9 | 2,0 | 0,35 | 0,35 | 6,0 |
| 10 | 1,2 | 0,5 | 0,2 | 4,5 |
| 11 | 1,2 | 0,5 | 0,5 | 4,5 |
| 12 | 2,0 | 0,35 | 0,35 | 6,0 |
| 13 | 2,0 | 0,65 | 0,35 | 6,0 |
| 14 | 1,2 | 0,5 | 0,5 | 7,5 |
| 15 | 2,8 | 0,5 | 0,5 | 7,5 |
| 16 | 1,2 | 0,2 | 0,2 | 7,5 |
| 17 | 3,6 | 0,35 | 0,35 | 6,0 |
| 18 | 2,8 | 0,2 | 0,2 | 4,5 |
| 19 | 1,2 | 0,5 | 0,2 | 7,5 |
| 20 | 2,8 | 0,5 | 0,2 | 7,5 |
| 21 | 2,0 | 0,35 | 0,35 | 6,0 |
| 22 | 2,0 | 0,35 | 0,35 | 9,0 |
| 23 | 2,8 | 0,5 | 0,2 | 4,5 |
| 24 | 2,0 | 0,35 | 0,35 | 6,0 |
| 25 | 2,0 | 0,35 | 0,05 | 6,0 |
| 26 | 2,8 | 0,2 | 0,5 | 7,5 |
| 27 | 2,0 | 0,35 | 0,35 | 6,0 |
| 28 | 1,2 | 0,2 | 0,2 | 4,5 |
| 29 | 2 | 0,35 | 0,35 | 3,0 |
| 30 | 2,8 | 0,2 | 0,5 | 4,5 |

A: concentración de HCl (mol/l). B and C: concentraciones de borohidruro de sodio e hidróxido de sodio (% m/v), respectivamente; y D: velocidad de flujo de N₂ (ml/min).

V.8.1. Disoluciones enzimáticas y membrana de diálisis.

Las disoluciones enzimática (pepsina de estómago porcino – Sigma Chemical Co. P-7000 y pancreatina porcina - Sigma Chemical Co. P-170) y sales biliares de origen porcino (Chemical Co. B-8631) fueron preparadas previo a su uso. La disolución de pepsina se preparó disolviendo 3,2 g de pepsina en 20 ml de HCl 0,1M; por otra parte, la disolución de pancreatina-sales biliares se preparó disolviendo 0,62 g de pancreatina y 4 g de sales biliares en 150 ml de NaHCO₃ 0,1 M.

Se utilizó una membrana de diálisis con un tamaño de poro (MMCO) > 12000 A° (Dia. Inf. 36/32”-28,6 mm, 30 m, Bestl n° 1063F09, Medicell Int. LTD, England), la cual fue lavada con agua destilada previo a su uso.

V.8.2. Ensayo de diálisis.

Para la determinación de la fracción de selenio que dializa a través de una membrana durante la etapa intestinal se utilizó el método descrito por Cámara et al. (2005) con algunas modificaciones. Para ello, 3 gramos de muestra liofilizada se homogeneizaron con 22 ml de agua destilada desionizada, ajustando hasta pH 2 con HCl 6 N; este es el pH óptimo de actuación de la pepsina.

Para la etapa de digestión gástrica a cada muestra se le añadió 0,5 g de la solución de pepsina; esta mezcla fue incubada en un baño con agitación a 37 °C durante 2 horas. Después de dicho lapso se introduce en el digerido la membrana de diálisis conteniendo 25 ml de agua destilada desionizada y una cantidad de NaHCO₃ equivalente a la acidez titulable (previamente determinada); la incubación fue continuada durante 45 minutos, posterior a los cuales se adicionaron 6 ml de la mezcla de pancreatina-sales biliares al digerido, incubando por 2 horas más. Transcurrido este periodo, se sacaron las membranas de diálisis, se enjuagaron con DDW, se pesó el dializado y se transvasó éste a envases de polipropileno para la posterior cuantificación de la fracción de selenio dializable mediante la técnica espectrométrica previamente optimizada y validada.

Los ensayos fueron realizados por sextuplicado y la acidez titulable fue definida como el número de equivalentes de NaOH necesarios para llevar la mezcla contentiva de pepsina, pancreatina y sales biliares a pH 7,5.

V.8.3. Ensayo de solubilidad

En los ensayos de solubilidad se siguió el mismo procedimiento descrito para los ensayos de diálisis hasta la digestión gástrica con pepsina; posterior a lo cual se ajustó el pH a 5 mediante adición de NaHCO_3 1M, se añadieron 6 ml de la mezcla pancreatina -sales biliares y continuó la incubación por 2 horas. Para detener la incubación la mezcla fue mantenida en un baño de hielo durante 10 minutos y se procedió a ajustar el pH a 7,2 mediante adición de NaOH 0,5 M; el digerido fue transferido a tubos de polipropileno de 50 ml y centrifugado (3500 g) por una hora a 4°C.

El sobrenadante fue pesado y una parte del mismo digerida hasta la destrucción completa de la materia orgánica, determinando el contenido de selenio soluble siguiendo el mismo procedimiento para la determinación de selenio total.

VI. RESULTADOS.

VI.1. OPTIMIZATION OF SELENIUM DETERMINATION BASED ON THE HG-ET-AAS METHOD FOR ITS APPLICATION TO DIFFERENT FOOD MATRICES

Optimization of Selenium Determination Based on the HG-ET-AAS Method for its Application to Different Food Matrices

J. R. Marval-León · F. Cámara-Martos · F. Pérez-Rodríguez ·
M. A. Amaro-López · R. Moreno-Rojas

Received: 6 September 2011 / Accepted: 22 November 2011 / Published online: 16 December 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Selenium is an important micronutrient in humans and animals, but also is considered toxic at relatively high levels, not far from physiological levels. The objective of this work was to optimize the determination of selenium by FIAS-furnace technique for its application in different food matrices. For that, the most influencing factors were previously selected: NaBH_4 (in percent weight per volume), HCl (in mole per liter), NaOH (in percent weight per volume), and carrier and reductant flow (in milliliters per minute). Based on these factors, a central composite rotatable design was applied with the calibration curves as optimization criterion. Results indicated that NaBH_4 presented the most significant effect, followed by the carrier and reductant flow which showed a negative effect (i.e., lower values resulted high sensitivity). Furthermore, all studied certified reference materials representing different food matrices resulted in very high recovery percentage (i.e., >95%), demonstrating the reliability of the analytical method.

Keywords HG-ET-AAS · FIAS-furnace technique · Selenium · Foods · Rotatable central composite design · RCCD

Introduction

Selenium is an essential micronutrient which is required at small levels by humans and animals. This micronutrient plays an important role in several physiological functions

such as forming part of the glutathione peroxidase (Burk et al. 1999) and the iodothyronine-5 deiodinases (Merian et al. 2004). However, selenium may also be toxic for many organisms when presented at high concentrations (Sager 1994) being one of the chemical elements in which there is less difference between essential and toxic levels. According to epidemiological studies, the upper safe limit for selenium might be in the range 750–800 $\mu\text{g/day}$ (Reid et al. 2004). However, values exceeding this threshold could cause adverse effect on health. Hence, it is necessary to develop sensible analytical methods to accurately determine its content in foods.

Currently, there are very sophisticated analytical methods such as mass detection which enables to identify different selenium species at low levels. However, many of these techniques are not available to most laboratories because of the high price and maintenance costs derived from the analytical equipment. The hyphenation of common techniques such as chromatography and atomic absorption or fluorescence spectrometry are more cost-effective alternatives to mass spectrometry. In this respect, hydride generation absorption spectrometry (HG-AAS) in conjunction with electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS), called flow injection atomic absorption spectrometry (FIAS)-furnace technique (or HG-ET-AAS), remains an interesting approach that deserves more research, since the limits of detection are of the same order as in mass techniques (Capelo et al. 2006).

Sensitivity and accuracy of analytical methods depend on numerous combinatorial interactions among operating factors. The optimum combination may be found using an effective experimental design procedure. Response surface methodology (RSM), which is a collection of statistical techniques for designing experiments, building models, evaluating the effects of factors, and searching for the optimum conditions,

J. R. Marval-León · F. Cámara-Martos (✉) · F. Pérez-Rodríguez ·
M. A. Amaro-López · R. Moreno-Rojas
Departamento de Bromatología y Tecnología de Alimentos,
University of Cordoba, Campus de Rabanales,
Edificio Darwin C-1,
14040 Córdoba, Spain
e-mail: bt2camaf@uco.es

has successfully been widely used in the optimization of analytical techniques (Bruns et al. 2006). The objective of this work was to apply central composite design (CCD) based on RSM to analyze the effects of the most significant operating factors in the determination of selenium by FIAS-furnace technique and to search for the optimal values for attaining a higher sensitivity and lower limit of detection.

Materials and Methods

Instrumentation

A Perkin-Elmer model AAnalyst600 atomic absorption spectrometer equipped with a Perkin-Elmer model FIAS 400 hydride generation system and an autosampler was used for the measurements. Electrodeless discharge lamp, operated from an external power supply, was used. The instrumental parameters which were set according to the manufacturer's instructions are shown in Tables 1, 2, and 3 except for the speed of pump 2 of the FIAS flow injection program used for hydride generation which was included as factor in the optimization study.

Reagents and Standard Solutions

All reagents were of analytical grade. Ultrapure water ($18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) prepared with a Milli-Q Reference Water Purification (Millipore, Madrid, Spain) was used throughout. All glassware and plastic containers were soaked in (1:1) nitric acid overnight and rinsed five times with deionized water prior to use.

Hydrochloric acid (35% w/w) and nitric acid (69% w/w), both quality hyperpure, were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Hydrogen peroxide (33% w/w), sodium hydroxide, and sodium tetrahydroborate (all for trace analysis) were acquired from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Iridium chloride 10% HCl (1,000 mg/L) was supplied by

Table 2 Furnace program for AAS measurements

| Step | Temperature (°C) | Ramp (s) | Hold (s) | Argon flow (ml/min) |
|------|------------------|----------|----------|---------------------|
| 1 | 250 | 1 | 50 | 0 |
| 2 | 250 | 1 | 20 | 250 |
| 3 | 1,950 | 0 | 5 | 0 |
| 4 | 2,300 | 1 | 3 | 250 |

Perkin Elmer (Madrid, Spain). Different concentrations prepared daily of HCl, NaBH_4 , and NaOH were used in the optimization of the operating conditions. The working standard solutions (0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 6.0, and 9.0 $\mu\text{g/L}$ of Se IV) used to generate the calibration curves were prepared daily by diluting the $1,000 \pm 5 \text{ mg/L}$ standard stock solution of selenium dioxide (Scharlau, Barcelona, Spain) in a dilution with HCl (1.2 mol/L) and HNO_3 (0.5 mol/L).

Five certified reference materials (CRM) were used to validate the accuracy of analytical method: SRM 1568a—rice flour, SRM 1570a—trace elements in spinach leaves, SRM 1549—nonfat milk powder (all from the National Institute of Standard and Technology, Gaithersburg, USA), BCR 185R—bovine liver (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium), and Dolt 4—dogfish liver (National Research Council, Canada).

Digestion Procedure

A microwave oven CEM MDS-2000 with operator selectable output of $0\text{--}630 \pm 50 \text{ W}$ in 1% increments was used for sample digestion. For digestion process, 0.5 g of each CRM was placed in teflon vessels designed to withstand an internal pressure of 200 psi. Then, 3 ml of concentrated HNO_3 (69% w/w) and 0.5 ml of H_2O_2 (33% w/w) was added to each vessel and kept for 10 min at room temperature. After sealing the vessels hermetically, they were placed in the microwave oven. The time/pressure program applied during sample digestion is shown in Table 4.

Once the vessels were cooled at room temperature, 3 ml of concentrated HCl (35% w/w) was added to each vessel to

Table 1 Operating parameters for the FIAS-furnace technique

| | |
|--|------------------------------|
| Wavelength (nm) | 196.0 |
| Lamp | Selenium hollow cathode lamp |
| Slit width (nm) | 0.7 |
| Lamp current (mA) | 290 |
| Injection volume (μL) | 500 |
| Carrier gas and its flow rate (ml/min) | Nitrogen, 150 |
| Reducing agent | NaBH_4 |
| Carrier solution | HCl |
| Background correction | Longitudinal Zeeman effect |

Table 3 FIAS flow injection program used for the hydride generation-AAS measurements

| Step | Time (s) | Speed of pump 1 (rpm) | Speed of pump 2 (rpm) |
|-----------|----------|-----------------------|-----------------------|
| Prefill | 15 | 100 | 0 |
| Fill | 15 | 100 | 0 |
| Fill | 5 | 100 | 80 |
| Injection | 30 | 0 | 80 |

Prefill step: FIAS autosampler sampling tube rinsed with simple solution (only done for the first replicate)

Table 4 Microwave oven program used for sample digestion

| Step | Power (%) | Pressure (psi) | Time (min) | TAP ^a (min) |
|------|-----------|----------------|------------|------------------------|
| 1 | 40 | 60 | 4 | 3 |
| 2 | 100 | 100 | 6 | 5 |
| 3 | 80 | 120 | 25 | 22 |
| 4 | 0 | 20 | 16 | 15 |

^aTime kept indicated pressure

obtain the reduction of Se(VI) to Se(IV). These vessels were hermetically closed and placed in the microwave oven for 2 min at a power of 20%. Every sample was diluted up to a volume of 25 ml with ultrapure water. To determine the limit of detection and limit of quantification, analytical blanks were prepared in similar manner without the addition of a sample.

Pretreating the Graphite Tube for the FIAS-Furnace Technique

Before using the graphite tube for hydride determinations, this was treated with a suitable chemical modifier such as iridium chloride. This pretreatment is usually sufficient for the lifetime of the tube if the clean-out temperature used during analyses does not exceed 2,300 °C. For that, 90 µL of the iridium chloride solution (1,000 mg/L) was injected four times. Each injection was dried following the furnace program shown in the Table 5.

Experimental Design

The combinations and interactions of operating factors in the determination of selenium by FIAS-furnace technique are large and the optimum processing conditions may be developed using an effective experimental design procedure. With the aim of maximizing the sensitivity of the method with respect to the selected operating factors, RSM was applied, and in particular, a CCD was developed. The CCD method does not make any assumptions about the structure of data, i.e., the number of distinct factor values, or their combinations. Hence, this methodology can be used to explain any experimental design and fit a response surface (RS) model to the data. When CCD is made rotatable,

Table 5 Program for pretreatment of graphite tube with iridium chloride

| Step | Temperature (°C) | Ramp (s) | Hold (s) | Argon flow (ml/min) |
|------|------------------|----------|----------|---------------------|
| 1 | 110 | 1 | 50 | 250 |
| 2 | 130 | 30 | 50 | 250 |
| 3 | 1,200 | 20 | 30 | 250 |
| 4 | 2,000 | 1 | 5 | 0 |

which means any rotation of the original design points will generate the same amount of information, the error on the response is reduced. Moreover, a rotatable central composite design (RCCD) does not need to use a complete three-level factorial experiment, thereby reducing the number of experiments. The RCCD and RSM were performed using Statgraphic statistical software (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

Results and Discussion

Our knowledge on the analytical method and operating factors together with scientific literature were applied to pick the most significant factors that influence the efficiency of the determination of selenium. According to Zhang and Adeloju (2008), the concentration of NaBH₄ (in percent weight per volume) as well as the type and concentration of acid (i.e., HCl—in mole/liter), which supplies the hydrogen required to form hydride, are two of the major operating factors influencing the efficiency of hydride generation. Similarly, we hypothesized that NaOH (in percent weight per volume) together with the speed of pump 2 (in revolutions per minute) of the FIAS flow injection used for the hydride generation (Table 3) could be other important factors influencing the sensitivity of the analytical technique. Note that the latter factor determines the carrier and reductant flow (in milliliters per minute), which subsequently reacts to form selenium hydride being subsequently transported to the graphite furnace in which it is trapped. For the sake of simplicity, from now on, this factor will be referred to as carrier and reductant flow throughout this work. Therefore, these four factors were selected to optimize the determination of selenium by FIAS-furnace technique.

The optimization study was statistically designed using a RCCD (Table 6) consisting of two level full factorial (2⁴) augmented for six center points and eight runs. Axial distances, α , of 2 were selected in order to establish the orthogonality and rotational conditions in the composite design. A set of 30 runs was carried out at different operating levels of the four selected factors as shown in Table 6. The runs were realized in random order because randomization helps the experimenter against reaching erroneous conclusions due to extraneous sources of variability. Each run was conducted and replicated three times. As the slope of the calibration curve is indicative of the sensitivity of the method, the determination coefficient (R^2) and slope (m) of the calibration curve were used as response in the optimization study. As commented in “Material and Methods” section, the range of the calibration standards for selenium was 0–9.0 µg/L.

Table 6 shows the results obtained for each of the trials included in the experimental design to identify the operating

Table 6 Rotatable composite central design used for optimization of selenium determination by FIAS-furnace

| Run | HCl (% w/v) | NaBH ₄ (% w/v) | NaOH (% w/v) | Carrier–reductant flow (ml/min) | Slope of calibration curve (<i>m</i>) | Coefficient of determination (<i>R</i> ²) |
|-----|----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------------|--|---|
| 1 | 0.4 | 0.35 | 0.35 | 6 | 0.0389 | 0.99925 |
| 28 | 1.2 | 0.2 | 0.2 | 4.5 | 0.0367 | 0.99839 |
| 16 | 1.2 | 0.2 | 0.2 | 7.5 | 0.0336 | 0.99902 |
| 6 | 1.2 | 0.2 | 0.5 | 4.5 | 0.0366 | 0.99846 |
| 5 | 1.2 | 0.2 | 0.5 | 7.5 | 0.0299 | 0.99696 |
| 10 | 1.2 | 0.5 | 0.2 | 4.5 | 0.0425 | 0.99952 |
| 19 | 1.2 | 0.5 | 0.2 | 7.5 | 0.0391 | 0.99798 |
| 11 | 1.2 | 0.5 | 0.5 | 4.5 | 0.0432 | 0.99916 |
| 14 | 1.2 | 0.5 | 0.5 | 7.5 | 0.0423 | 0.99985 |
| 2 | 2 | 0.05 | 0.35 | 6 | 0.019 | 0.99861 |
| 25 | 2 | 0.35 | 0.05 | 6 | 0.0401 | 0.99929 |
| 29 | 2 | 0.35 | 0.35 | 3 | 0.043 | 0.99884 |
| 24 | 2 | 0.35 | 0.35 | 6 | 0.0398 | 0.99922 |
| 4 | 2 | 0.35 | 0.35 | 6 | 0.04 | 0.99883 |
| 27 | 2 | 0.35 | 0.35 | 6 | 0.0405 | 0.99919 |
| 21 | 2 | 0.35 | 0.35 | 6 | 0.0406 | 0.99958 |
| 12 | 2 | 0.35 | 0.35 | 6 | 0.0412 | 0.99881 |
| 9 | 2 | 0.35 | 0.35 | 6 | 0.0415 | 0.99947 |
| 22 | 2 | 0.35 | 0.35 | 9 | 0.037 | 0.99888 |
| 8 | 2 | 0.35 | 0.65 | 6 | 0.042 | 0.99918 |
| 13 | 2 | 0.65 | 0.35 | 6 | 0.0432 | 0.99936 |
| 18 | 2.8 | 0.2 | 0.2 | 4.5 | 0.0373 | 0.99875 |
| 7 | 2.8 | 0.2 | 0.2 | 7.5 | 0.0375 | 0.99953 |
| 30 | 2.8 | 0.2 | 0.5 | 4.5 | 0.0383 | 0.99792 |
| 26 | 2.8 | 0.2 | 0.5 | 7.5 | 0.0374 | 0.99981 |
| 23 | 2.8 | 0.5 | 0.2 | 4.5 | 0.0442 | 0.99995 |
| 20 | 2.8 | 0.5 | 0.2 | 7.5 | 0.0416 | 0.9994 |
| 3 | 2.8 | 0.5 | 0.5 | 4.5 | 0.0447 | 0.99957 |
| 15 | 2.8 | 0.5 | 0.5 | 7.5 | 0.0425 | 0.99966 |
| 17 | 3.6 | 0.35 | 0.35 | 6 | 0.0412 | 0.99921 |

factors affecting the analytical determination of selenium. The RS model developed for the slope (*m*) of the calibration curve showed a good fitting to data with $R^2=0.90$, whereas the model obtained for R^2 of the calibration curve presented a lower value of R^2 which was equal to 0.57. The Pareto diagram in Fig. 1 shows the effects of the different operating factors for the slope of the calibration curve (*m*) and coefficient of determination (R^2). As seen in Fig. 1a, significant effects were produced by HCl (in mole per liter), NaBH₄ (in weight per volume), and carrier flow rate (in milliliters per minute). However, the factor producing the highest effect corresponded to factor NaBH₄ (in weight per volume), followed by the carrier and reductant flow (in milliliters per minute) and finally HCl (in mole per liter). In the case of NaBH₄ (in weight per volume) and HCl (in mole per liter), the effect was positive, that is, the higher value of these factors, the higher response is obtained. However, the

carrier and reductant flow (in milliliters per minute) presented a negative effect which means that reducing the carrier and reductant flow prompts a higher response (i.e., *m*). Similar results can be observed in Fig. 1b, although in this case only NaBH₄ (in weight per volume) was significant. Results from the analysis of variance of the RS model are presented in Tables 7 and 8 for the slope and R^2 of the calibration curves, respectively. These tables show the statistical significance of the individual and combined effects of the studied factors on the slope and R^2 . These results from the analysis of variance corroborated the conclusions withdrawn from the Pareto diagram for slope and R^2 , identifying the same significant factors, which showed *p* values <0.05 in Tables 7 and 8. Figure 2 shows the three-dimensional response surface to demonstrate the positive correlation of NaBH₄ (in weight per volume) and negative correlation for carrier and reductant flow (in milliliters per minute) on the slope (*m*) of the

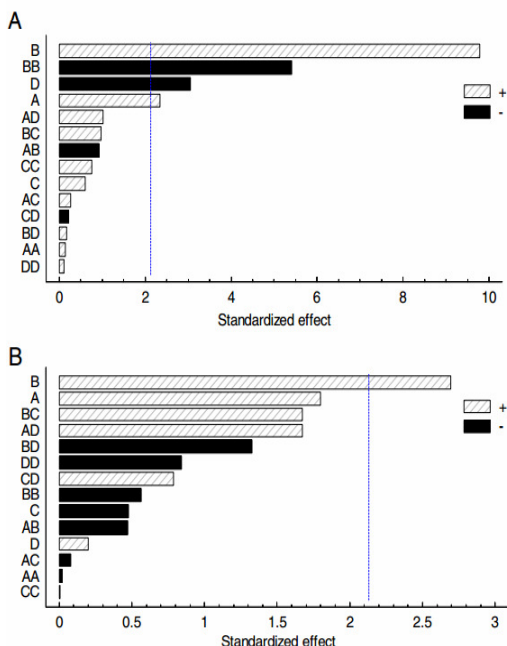


Fig. 1 (a) Standardized main effects of Pareto charts for the rotatable composite central design for the different operating factors and response, slope (m) and (b) coefficient of determination (R^2). Vertical dashed line corresponds to the significant level ($P=0.95$). A: HCl concentration (mol/L); B: NaBH₄ (w/v); C: NaOH (w/v); D: carrier-reductant flow (ml/min)

Table 7 Analysis of variance of the effects of the operating factors on the slope (m) of the calibration curve of selenium

| Effect | Sum of squares | df | F test | p value |
|---------------|-----------------------|----|--------|---------|
| A | 2.44×10^{-5} | 1 | 5.47 | 0.0336 |
| B | 4.27×10^{-4} | 1 | 95.70 | 0.0000 |
| C | 1.60×10^{-5} | 1 | 0.36 | 0.5579 |
| D | 4.16×10^{-5} | 1 | 9.33 | 0.0080 |
| A | 8.68×10^{-8} | 1 | 0.02 | 0.8909 |
| AB | 3.80×10^{-5} | 1 | 0.85 | 0.3704 |
| AC | 3.02×10^{-7} | 1 | 0.07 | 0.7980 |
| AD | 4.62×10^{-6} | 1 | 1.04 | 0.3247 |
| BB | 1.30×10^{-4} | 1 | 29.27 | 0.0001 |
| BC | 4.20×10^{-5} | 1 | 0.94 | 0.3470 |
| BD | 1.22×10^{-7} | 1 | 0.03 | 0.8706 |
| CC | 2.57×10^{-6} | 1 | 0.58 | 0.4593 |
| CD | 2.02×10^{-7} | 1 | 0.05 | 0.8341 |
| DD | 5.25×10^{-8} | 1 | 0.01 | 0.9150 |
| Total error | 6.69×10^{-6} | 15 | | |
| Total (corr.) | 7.20×10^{-4} | 29 | | |

A HCl concentration (in mole per liter), B NaBH₄ (in weight per volume), C NaOH (in weight per volume), D carrier-reductant flow (in milliliters per minute)

Table 8 Analysis of variance of the effects of the operating factors on the coefficient of determination (R^2) of the calibration curve of selenium

| Effect | Sum of squares | df | F test | p value |
|---------------|------------------------|----|--------|---------|
| A | 1.11×10^{-6} | 1 | 3.23 | 0.0923 |
| B | 2.50×10^{-6} | 1 | 7.27 | 0.0166 |
| C | 7.82×10^{-8} | 1 | 0.23 | 0.6406 |
| D | 1.35×10^{-8} | 1 | 0.04 | 0.8455 |
| AA | 1.07×10^{-10} | 1 | 0.00 | 0.9861 |
| AB | 7.70×10^{-8} | 1 | 0.22 | 0.6431 |
| AC | 2.26×10^{-7} | 1 | 0.01 | 0.9366 |
| AD | 9.65×10^{-7} | 1 | 2.80 | 0.1148 |
| BB | 1.10×10^{-7} | 1 | 0.32 | 0.5809 |
| BC | 9.65×10^{-7} | 1 | 2.80 | 0.1148 |
| BD | 6.04×10^{-7} | 1 | 1.76 | 0.2051 |
| CC | 1.46×10^{-11} | 1 | 0.00 | 0.9949 |
| CD | 2.14×10^{-7} | 1 | 0.62 | 0.4429 |
| DD | 2.45×10^{-7} | 1 | 0.71 | 0.4124 |
| Total error | 5.17×10^{-6} | 15 | | |
| Total (corr.) | 1.20×10^{-5} | 29 | | |

A HCl concentration (in mole per liter), B NaBH₄ (in weight per volume), C NaOH (in weight per volume), D carrier-reductant flow (in milliliters per minute)

calibration curve. As the RS model for m presented much better fitting than the model for R^2 , the combination of factors optimizing the determination of selenium by FIAS-furnace technique was obtained by maximizing m of the calibration equation. The values of the factors for the optimized m , which corresponded to 0.0461087, are presented in Table 9.

Effect of Sodium Borohydride Concentrations

In order to obtain the maximum signal, the effect of NaBH₄ concentration was tested over the range of 0.05–0.65% (in weight per volume). Experimental results revealed that the

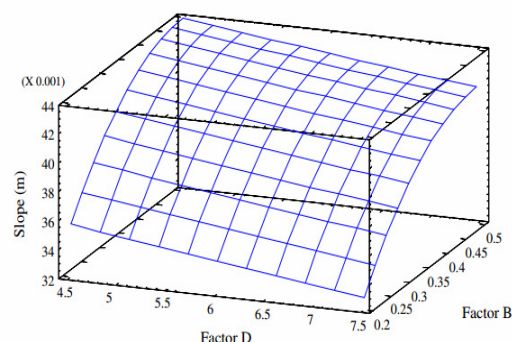


Fig. 2 Surface response model for NaBH₄ (Factor B) and carrier-reductant flow (Factor D) and slope of the calibration curve (m) derived from the rotatable composite central design

Table 9 The factors and their levels used for the optimization of the parameters for selenium determination by FIAS-furnace technique

| Factor | Low | High | Optimum |
|---------------------------------|------|------|---------|
| HCl (% w/v) | 0.4 | 3.6 | 1.01 |
| NaBH ₄ (% w/v) | 0.05 | 0.65 | 0.51 |
| NaOH (% w/v) | 0.05 | 0.65 | 0.65 |
| Carrier–reductant flow (ml/min) | 3.0 | 9.0 | 3.0 |

analytical signal reached its optimum value at 0.51% (in weight per volume) NaBH₄. This value is higher than those reported by other studies of optimization on the determination of selenium by HG-AAS which ranged between 0.1 and 0.2% (in weight per volume) (Türker and Erol 2009; Zhang and Adeloju 2008; Näykki et al. 2001). The positive effect of the NaBH₄ concentration on the increase of sensitivity can be explained due to this compound which acts as reductor and forms hydride. In this respect, NaBH₄ has been reported as an energetic reductor in a strong acid media because of the formation of hydrogen, hence higher concentrations of NaBH₄ result in more improved sensitivity (Zhang and Adeloju 2008). Nonetheless, this increase is not unlimited since very high concentrations of this substance can lead to a rapid absorbance drop, making the signal unstable. This fact can also be observed in our work since when NaBH₄ was used at a level of 0.65% (in weight per volume), measured absorbance dropped slightly.

Effect of Hydrochloric Acid Concentrations

The main drawback of the determination of selenium by HG-AAS is that only Se(IV) forms the volatile selenium hydride H₂Se, hence all selenium species have to be transformed into Se(IV) prior to the hydride formation (Capelo et al. 2006). Prereductants as thiourea can reduce Se(VI) to the elemental state and the formation of hydride becomes impossible (Uggerud and Lund 1995). An often practice is to utilize HCl to reduce Se(VI) to Se(IV). Besides that, the control of the medium in which the hydride is generated is very important as pointed out previously, since the efficiency of generation of hydride depends on the medium acidity in addition to the concentration of borohydride. In our study, the effect of various HCl concentrations on the signal intensity was tested over the range 0.4–3.6 mol/L. The optimum sensitivity for HCl concentrations was obtained around 1.01 mol/L. This value is quite similar to that found by other study about optimization of selenium analysis by HG-AAS (Türker and Erol 2009) which showed that the recovery of selenium is maximal at an HCl concentration of 1.2 mol/L approximately and slightly decreased above and below this concentration. Also, other study (Zhang

Table 10 Detection limits and quantification limits of selenium determination methods

| Method | LOD (µg/L) | LOQ (µg/L) | Reference |
|------------------------------|------------|------------|------------------------|
| ET-AAS with deuterium | 1.70 | 5.00 | Hegedüs et al. 2008 |
| ET-AAS with Zeeman | 1.10 | 3.30 | Hegedüs et al. 2008 |
| HG-AAS | 0.49 | 1.70 | Hegedüs et al. 2008 |
| HG-AAS | 0.78 | 2.57 | Türker and Erol 2009 |
| HG-AAS | 0.13 | 0.29 | Näykki et al. 2001 |
| HG-AAS | 0.20 | – | Zhang and Adeloju 2008 |
| HG-ET-AAS | 0.60 | – | Tsalev et al. 2001 |
| ET-AAS with preconcentration | 0.01 | – | Saygi et al. 2007 |
| ET-AAS with preconcentration | 0.03 | – | Tuzen et al. 2007 |

LOD limit of detection, LOQ limit of quantification, ET-AAS electrothermal atomic absorption spectrometry, HG-AAS hydride generation absorption spectrometry

and Adeloju 2008) showed an optimum value in the range 0.5–1.0 mol/L HCl. In line with this, a recent research (Saygi et al. 2007) about speciation of Se(IV) and Se(VI) using a preconcentration of the sample by means of solid-phase extraction with a Diaion resin and subsequently by determination with ET-AAS graphite furnace found that Se(IV) was quantitatively recovered to 100%, approximately in the pH range of 1.0–2.5. The same authors have carried out other study (Tuzen et al. 2007) of separation and speciation of selenium in foods using the combination of magnesium hydroxide coprecipitation and ET-AAS graphite furnace. Basically, this method consists of separating the different species of selenium by formation of a precipitate of magnesium hydroxide, removal of the supernatant, and subsequently redissolution of this precipitate with HNO₃ and distilled water. In this study, the adjustment of pH played a crucial role in the recovery of 100% selenium. In the light of these results, it can be concluded that the HCl concentration, and therefore, the adjustment of the final pH plays an important role in the different techniques of determination and speciation of Se.

Table 11 Determination of selenium in different CRMs by FIAS-furnace technique optimized

| Sample | Certified (µg/g) | Recovered (µg/g) | Recovery (%) |
|--|------------------|------------------|--------------|
| SRM 1568 (rice flour) ^a | 0.38±0.04 | 0.36±0.01 | 95 |
| SRM 1549 (nonfat milk powder) ^b | 0.11±0.01 | 0.11±0.00 | 100 |
| SRM 1570 (spinach leaves) ^a | 0.117±0.009 | 0.111±0.010 | 95 |
| BCR-185R (bovine liver) | 1.68±0.14 | 1.64±0.04 | 98 |
| Dolt-4 (dogfish liver) | 8.3±1.3 | 8.6±0.1 | 104 |

Effect of Sodium Hydroxide Concentrations

The effect of the concentration of NaOH tested in a similar range to NaBH₄ does not produce any effect since this compound only works as stabilizer of the NaBH₄ solution (Näykki et al. 2001).

Effect of the Carrier and Reductant Flow

As aforementioned, the carrier and reductant flow is related to the speed of pump 2 of the FIAS flow injection which represents the speed with which reagents start to flow, forming the selenium hydride which flows into the graphite tube. This was studied in the interval from 3 to 9 mL/min (40 to 120 rpm of the speed pump 2) of reductant flow which maintains a ratio of 1:2 with the carrier flow. This factor was negatively correlated to the selenium sensitivity achieving an optimum value of 3 mL/min (i.e., 40 rpm of the speed pump 2). This effect is related to the slight improvement of the selenium sensitivity when the injection of NaBH₄ is performed in intermittent manner in comparison to continuous input of the reductant (Zhang and Adeloju 2008) as in the latter case since there is a dilution of the hydride with the hydrogen produced because of the excess NaBH₄. Therefore, it can be put forward that high speeds hamper a suitable reaction in addition to prompting the mentioned dilution effect of hydride.

Validation of the Method

There was a linear relationship between absorbance and selenium concentration in the range 0.5–9.0 µg/L at the optimum experimental conditions determined above. The calibration equation was $Abs = 0.0419 [Se] + 0.0179$ with $R^2 = 0.9985$.

Limit of detection (LOD) (blank+3σ) and limit of quantification (LOQ) (blank+10σ) were determined in aqueous solutions. The obtained values for LOD and LOQ based on the optimized FIAS parameters were 0.09 and 0.30 µg/L, respectively. In Table 10, literature values for LOD and LOQ are reported, taken from studies determining selenium by ET-AAS or by HG-AAS. As expected, LOD and LOQ values for ET-AAS are higher than those obtained for HG-AAS which is due to the interference caused by the presence of contaminants in samples and by the reagents or their own products of decomposition which make necessary to use chemical modifiers such as rhodium, nickel, copper, palladium, and magnesium, which could not be fully eliminated even using high pyrolysis temperatures (Bohrer et al. 2007). The use of HG-AAS allows to improve LOD and LOQ since interferences are minimized by separating the analyte from the simple matrix as its hydride. However, a limitation of the technique is that many metal hydrides are not efficiently

atomized at the maximal temperature of the heated quartz tubes, which leads to significant gas phase interferences (Petrick and Krivan 1987).

The combination of both techniques in the FIAS-furnace technique and its optimization have allowed to reduce LOD and LOQ, enabling to detect selenium almost at nanogram levels without the typical equipment and high maintenance costs derived from mass techniques. Only recent studies using ET-AAS combined with preconcentration by using resins (Saygi et al. 2007) or coprecipitation with magnesium hydroxide (Tuzen et al. 2007) could obtain LOD values similar to those obtained in our study.

The accuracy and precision of the method were verified by recovery experiments using CRMs. The analytical procedure described here (digestion, reduction with HCl, FIAS-furnace program optimized) was evaluated by analyzing five CRMs representing plant and meat foods. As can be seen in Table 11, very high accuracy and precision were obtained for all studied CRMs, with recovery percentage very close to 100%, underpinning the reliability of the optimized analytical method.

Conclusions

The estimation of the sensitivity and accuracy of the determination of selenium in foods and diets is required as there is a narrow margin between dietary and toxic doses for this element. Determining selenium by spectrophotometric techniques is mainly performed with ET-AAS or HG-AAS; however, both present drawbacks and advantages. The hyphenation of both techniques in the FIAS-furnace technique and its optimization by applying response surface methodology based on a CCD has demonstrated that this technique may detect selenium levels below 0.1 µg/L. The results revealed that sodium borohydride concentration and carrier and reductant flow are the most important factors affecting the sensitivity of selenium. The validation method with CRMs representing different types of food matrices, including vegetable and animal foods, resulted in levels of accuracy and precision close to 100% endorsing thus the application of HG-ET-AAS for selenium in foods.

References

- Bohrer D, Becker E, Nascimento PCdo, Dessuy M, de Carvalho LM (2007) Food Chem 104:868
- Bruns RE, Scarminio IS, Barros Neto B (2006) Statistical design—chemometrics: data handling in science and technology. Elsevier, Amsterdam
- Burk RF, Levander OA, Shils ME, Olson JA, Shike M (1999) Selenium. In: Modern nutrition in health and disease. Williams and Wilkins, Baltimore, p 265

- Capelo JL, Fernández C, Pedras B, Santos P, González P, Vaz C (2006) *Talanta* 68:1442
- Hegedüs O, Hegedüsova A, Simkova S, Pavlik V, Jomová K (2008) *J Biochem Biophys Methods* 70:1287
- Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M (2004) *Metals and their compounds*. Volume 1. Wiley, Weinheim, p 263
- Näykki T, Perämäki P, Kujala J, Mikkonen A (2001) *Anal Chim Acta* 439:229
- Petrick K, Krivan V (1987) *Fresenius Z Anal Chem* 327:338
- Reid ME, Stratton MS, Lillico AJ, Fakir M, Natarajan R, Clark LC, Marshall JR (2004) *J Trace Elem Med Biol* 18:69
- Sager M (1994) *Spureanalytik des selens, Analytiker taschenbuch, Band 12*. Springer, Berlin
- Saygi KO, Melek E, Tuzen M, Soylak M (2007) *Talanta* 71:1375
- Tsalev DL, Lampugnani L, D'Ulivo A, Petrov I Jr, Georgieva R, Marcucci K, Zamboni R (2001) *Microchem J* 70:103
- Türker AR, Erol E (2009) *Int J Food Sci Nutr* 60(1):40
- Tuzen M, Saygi KO, Soylak M (2007) *Talanta* 71:424
- Uggerud H, Lund W (1995) *J Anal At Spectrom* 10:405
- Zhang Y, Adeboju SB (2008) *Talanta* 76:724

VI.2. BIOACCESSIBILITY AND CONTENT OF SE IN FISH AND SHELLFISH WIDELY CONSUMED IN MEDITERRANEAN COUNTRIES: INFLUENCE OF PROTEINS, FAT AND HEAVY METALS.



<http://informahealthcare.com/ijf>
ISSN: 0963-7486 (print), 1465-3478 (electronic)

Int J Food Sci Nutr, 2014; 65(6): 678–685
© 2014 Informa UK Ltd. DOI: 10.3109/09637486.2014.908173

informa
healthcare

FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS

Bioaccessibility and content of Se in fish and shellfish widely consumed in Mediterranean countries: influence of proteins, fat and heavy metals

Jean Rafael Marval-León, Fernando Cámara-Martos, Manuel Angel Amaro-López, and Rafael Moreno-Rojas

Dpto, Bromatología y Tecnología de Alimentos, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales s/n, Edificio Darwin C1, Córdoba, Spain

Abstract

Twenty samples of fish and seafood products were selected for determination of total and bioaccessible Se (i.e. soluble and dialyzable). The Se contents ranged between 0.638–0.052 µg/g. The samples of fatty fish such as mackerel and tuna showed higher contents than the species of lean fish, and mainly the fresh water fish, such as salmon, trout and panga showed the lowest contents. The fraction of soluble Se ranged between 43–84% while that the fraction of dialyzable Se did not exceed 14%. No statistically significant correlation was observed between protein content and total and bioaccessible Se content. In contrast, a negative interaction was observed between bioaccessible Se and fat content, and between bioaccessible Se and presence of heavy metals like Cd.

Keywords

Bioaccessibility, cadmium, fish, protein, seafood, selenium, trace elements

History

Received 15 November 2013
Revised 16 February 2014
Accepted 21 March 2014
Published online 11 April 2014

Introduction

Spain is next with France, Italy, Portugal and Greece among the five countries in the European Union with greater coastal shoreline and number of available fish resources. In 2009, total consumption of these products (fish, seafood, and canned fish and shellfish) reached 1.58 million tons, which is equivalent to a per capita consumption of 27.6 kg per inhabitant (Martín Cerdeño, 2010). These figures make the Spanish population one of the largest consumers of fish worldwide.

Fish consumption is especially beneficial to health due to its high-protein content which is of important nutritional value, together with vitamin D and trace elements such as Se (Berr et al., 2009; Fisher, 2004; Smith & Sahyoun, 2005). This later component is an essential micronutrient for humans, despite its toxicity at high concentrations, as it is a part of the active site of glutathione peroxidase. This enzyme in combination with vitamin E catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and other hydroperoxides protecting cell membranes from oxidative damage (Rayman, 2000). Besides, Se is also a component of selenoproteins with numerous functions ranging from thyroid metabolism (desiodases) to thioredoxin reductases (TR1-3) and selenoprotein P (Burk et al., 2006; Hill et al., 2007; Tapiero et al., 2003). On the other hand, the particularity of Se is that the margin between toxicity and deficiency is very narrow. According to the US Food and Nutrition Board, the recommended dietary allowance has been set at 55 µg/day for both sexes, whereas the tolerable upper intake level (UL) is advised at 400 µg/day in the USA and 300 µg/day in Europe (SCF, 2000; Thiry et al., 2012; USDA, 2011a,b). Exceeding this UL can lead to selenosis which include symptoms as garlic odor on the breath, gastrointestinal disorders, hair loss,

sloughing of nails, fatigue, irritability and neurological damage among others.

In relation to this, there have been several studies determining the total Se content present in foodstuffs and diets since this is the only way of providing Se to our body (Choi et al., 2009; Pappa et al., 2006; Satovic & Beker, 2004; Sigrist et al., 2012). However, to the best of our knowledge, there is still a relatively limited number of studies dealing with the amount of Se present in the food that is actually absorbed and therefore capable of being used by the body; i.e. the bioaccessibility. In contrast, non-accessible Se cannot be absorbed through the intestinal membrane and is directly excreted without having affected the body mechanism. This bioaccessible fraction of element can be easily determined by *in vitro* simulation of the gastro-intestinal digestion and, although ideally determinations would be performed with the use of *in vivo* models (human or animals), *in vitro* techniques have been widely used because of its good correlation with *in vivo* studies (Cámara et al., 2005; Intawongse & Dean, 2006; Juhasz et al., 2007; Moreda-Piñeiro et al., 2013).

Besides physiological factors related to the person includes health status, age, sex and lifestyle (Thompson, 2004). Se bioavailability depends on the chemical form in which it is present in the food. These are mainly grouped into two forms, namely organic (selenomethionine, selenocysteine and their methylated form) and inorganic (being two oxyanions, selenite and selenate the best known species) (Thiry et al., 2012). Bioavailability of organic forms is significantly higher compared to the inorganic ones (Dumont et al., 2006; Fairweather-Tait et al., 2010). Furthermore the chemical form of Se partially determines Se metabolism. Inorganic salts of Se (selenite and selenate) enter a reductive pathway and ultimately form reduced selenide. The amino acid selenomethionine can substitute for methionine in proteins or it can be converted to selenocysteine, which subsequently may be cleaved to form selenide (Finley, 2006). Finally, the presence of other components such as proteins, lipids, heavy metals and fiber may also increase or decrease the

Correspondence: Fernando Cámara-Martos, Dpto, Bromatología y Tecnología de Alimentos, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales s/n, Edificio Darwin C1, Córdoba 14014, Spain. E-mail: bt2camaf@uco.es

bioavailability of this element (Combs & Combs, 1986; Fairweather-Tait, 1997).

Therefore, the objective of this paper is to determine the total Se content in a wide variety of seafood consumed by the Spanish population and the influence of other components (proteins, fat, and heavy metals as cadmium) on its bioavailability. The results could be used to develop a database of Se in food and to make recommendations, prevention, treatment and control of diseases related to the intake of this element.

Materials and methods

Materials

Digestive enzymes and bile salts were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The working solutions of these enzymes were prepared immediately before use. Pepsin solution was obtained by dissolving 3.2 g of pepsin (P-7000 from porcine stomach) in 20 ml of HCl (0.1 M). The solution of pancreatin and bile salts were prepared by dissolving 0.62 g of pancreatin (P-170 from porcine pancreas) and 4 g of bile salt (B-8631 of porcine origin) in 150 ml of 0.1 M NaHCO₃. The dialysis membranes, with a pore size (MMCO) of >12 000 Å (Dia. Inf. 36/3200–28.6 mm, 30 m, Bestl no. 1063F09, Medicell Int. LTD, London, UK), were rinsed several times with distilled deionized water before use. Standard Se solutions were prepared immediately before use by dilution (with distilled deionized water) of a 1000 mg/l standard solution (Titrisol, Merck, Darmstadt, Germany). All reagents used were of analytical grade, and Millipore-MilliQ distilled deionized water was used throughout. Glass and polyethylene material was soaked in HNO₃ (sp. gr. 1.38) for 15 min and then rinsed three times with distilled deionized water.

Samples

Twenty samples of fresh fish and shellfish widely consumed in Spain were purchased in three shopping centers and three small fish markets in the city of Cordoba (Spain) during the months of September 2011 to March 2012. In order to get a representative sample all species analyzed were purchased in the six outlets indicated, at different times throughout the study period. In total, the number of analyzed samples corresponded to 360 (18 for each fish specie). The samples were transported to the laboratory under refrigeration conditions. Upon arrival at the laboratory the inedible part of the samples was discarded while the edible portion was washed with deionized distilled water (DDW) to remove traces of blood and dirt. Finally, samples were finely chopped, freeze-dried, packed in polypropylene jars and frozen in a still-air freezer at –18 °C and until required for analyses and processing.

Bioaccessibility method: dialysis and solubility

The method described by Cámara et al. (2005) with slight modifications, was applied to estimate dialyzable Se. Three grams of lyophilized sample of each fish or shellfish were homogenized with 22 g of deionised distilled water, and the pH was adjusted to 2.0 with 6 N HCl. To carry out pepsin–HCl digestion, 0.5 g of pepsin solution per 100 g of homogenized was added (corresponding to 0.125 g of porcine pepsin by 3 g of lyophilized sample). The mixture was then incubated for 2 h at 37 °C in a shaking water bath (HSB-2000 Shaking Bath; E-Chrom Tech CO., LTD, Taipei, Taiwan). A dialysis bag (molecular mass cut-off value 10–12 000 Da) containing 25 ml of water and an amount of NaHCO₃ equivalent to the titratable acidity (previously measured) was placed in the flasks, together with 30 g aliquots of the pepsin digest. Incubation was continued for 45 min, the pancreatic-bile salt mixture (6 ml) was added, and incubation was

continued up to 2 h. After incubation, the segments of dialysis tubes were removed from the flasks, washed and weighed. The titratable acidity was defined as the number of equivalents of NaOH required to titrate the combined pepsin digest pancreatin–bile salts mixture to pH 7.5. The above assay was repeated 6 times for each fish species studied. Se content of the dialysis tubes were analyzed by hydride generation in conjunction with electrothermal atomisation called FIAS-furnace technique (or HG-ET-AAS) (Marval-León et al., 2012).

For solubility assay a procedure similar to dialysis assay was followed to the stage of gastric digestion with pepsin. Prior to the intestinal digestion step, the pH of the gastric digests was raised to 5 by drop-wise addition of 1 M NaHCO₃. Then the pancreatin–bile salt mixture were added and incubation was continued up to 2 h. To stop intestinal digestion, the sample was maintained for 10 min in an ice bath. The pH was adjusted to 7.2 by drop-wise addition of 0.5 M NaOH. Aliquots of the digested sample were transferred to polypropylene centrifuge tubes (50 ml, Costar Corning Europe, Badhoevedorp, The Netherlands) and centrifuged (3500g) for 1 h at 4 °C. Then, the supernatant (soluble fraction) was collected, its organic matter was destroyed, and the mineral content was measured by HG-ET-AAS (Marval-León et al., 2012).

Se content determination

Prior to the HG-ET-AAS determination of Se from fishes, mineral, soluble and dialyzable fractions, the organic matter was destroyed. For this, a microwave oven CEM MDS-2000 with operator selectable output of 0–630 ± 50 watts in one percent increments was used for sample digestion. For digestion process, a certain amount of sample (0.5 g for lyophilized sample, 1 g for soluble fraction or 5 g for dialyzed fraction) were placed in teflon vessels designed to withstand an internal pressure of 200 psi. Then, 3 ml of concentrated HNO₃ (69% w/w) and 0.5 ml of H₂O₂ (33% w/w) were added to each vessel and kept for 10 min at room temperature. After vessels were hermetically sealed, they were placed in the microwave oven. The time/pressure program applied during sample digestion is shown in the Table 1. Once vessels were cooled at room temperature, 3 ml of concentrated HCl (35% w/w) were added to each vessel to obtain the reduction of Se (VI) to Se (IV). These vessels were hermetically closed and placed in the microwave oven for 2 min to a power of 20%. Every sample was diluted up to a volume of 25 ml with ultrapure water.

A Perkin-Elmer model AAnalyst 600 atomic absorption spectrometer (Perkin-Elmer, Waltham, MA) equipped with a Perkin-Elmer model FIAS 400 hydride generation system and an autosampler was used for the measurements. Electrodeless discharge lamp, operated from an external power supply was used. The instrumental parameters are derived from an optimization work prior to Se determination (Marval-León et al., 2012) which are shown in Tables 2 and 3. Se determinations gave a limit of detection (LOD) and a limit quantification (LOQ), based on the 3SD/10SD criterion, respectively (SD standard deviation of eleven measurements of a reagent blank), of 0.09 and 0.30 µg/L, respectively. Accuracy of the method was assessed by analyzing SRM 1568 (rice flour), SRM 1549 (non-fat milk powder), SRM

Table 1. Microwave oven program used for sample digestion.

| Step | Power (%) | Pressure (psi) | Time (min) | TAP* (min) |
|------|-----------|----------------|------------|------------|
| 1 | 40 | 60 | 4 | 3 |
| 2 | 100 | 100 | 6 | 5 |
| 3 | 80 | 120 | 25 | 22 |
| 4 | 0 | 20 | 16 | 15 |

*Time kept indicated pressure.

1570 (spinach leaves), BCR 185R (bovine liver) and Dolt-4 (dogfish liver). Values of $0.36 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$; $0.11 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$; $0.111 \pm 0.010 \mu\text{g/g}$; $1.64 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$; $8.6 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ were found for SRM 1568, SRM 1549, SRM 1570, BCR 185R and Dolt-4, respectively which are in good agreement with the certified values ($0.38 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$; $0.11 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$; $0.117 \pm 0.009 \mu\text{g/g}$; $1.68 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$; $8.3 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$; respectively) (Marval-León et al., 2012). Recovery studies were carried out by adding well-known concentrations of Se to some samples of fish and performing sample treatment and subsequently analysis under optimized conditions (Table 4).

Dialysis mineral percentages were calculated as follows: Dialysis (%) = $100 \cdot D/C$, where D = dialyzed mineral content ($\mu\text{g/g}$ sample) and C = total mineral content ($\mu\text{g/g}$ sample). Soluble mineral percentages were calculated as follows: Solubility (%) = $100 \cdot S/C$, where S = soluble mineral content ($\mu\text{g/g}$ sample) and C = total mineral content of the sample ($\mu\text{g/g}$ sample).

Protein, fat and Cd content determinations

AOAC methods (2005) were used to determine the proximate composition: defatting in a Soxhlet apparatus with petroleum ether for crude fat and micro-Kjeldahl for protein. Analytical

determinations of Cd were measured by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry (GF-AAS) using pyrolytic THGF tubes (transverse heated graphite furnace) in a Perkin Elmer AA600 equipped with a Zeeman furnace module and an autosampler AS-800, controlled by the WinLab 32 software (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Thermal programme used for the determination of Cd in the graphite furnace is shown below [Temperature/Rise time/Hold time/Argon flux]: Evaporation of the solvent (130°C , 10 s, 45 s, 300 mL/min); Drying (300°C , 10 s, 20 s, 300 mL/min); Pyrolysis (800°C , 10 s, 20 s, 300 mL/min); Atomisation (1450°C , 0 s, 4 s, 0 mL/min); Cleaning (2600°C , 2 s, 2 s, 300 mL/min);

Statistics

Data were analyzed using SPSS 15.0 (IBM, Armonk, NY). Pearson's correlation coefficient was used for determining dependence between variables. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

Results and discussion

Se content

Se concentration in foods mainly depends on the content of this element in the soil where the animal was raised or the plant was grown (Hartikainen, 2005). Accordingly it can be assumed that the Se content in the fish tissue would be correlated with its natural concentration into the wild (sea or river) and in feeding of these fish species (Satovic et al., 2003). This is due to the fact that principal source of Se is the weathering of rocks, thus, those parts of the crust derived from Cretaceous rocks tend to have higher concentrations of Se (Presser et al., 1994). Therefore, dietetic intake of Se varies considerably across populations around the world, according to the geographical region.

In any case, the Se-rich foods are liver and kidneys since they are the main organs where Se is metabolized (Levander, 1987), followed by rich-protein foods, in which fish and shellfish have

Table 2. Operating parameters for the FIAS-furnace technique (HG-ET-AAS).

| | |
|--|------------------------------|
| Wavelength (nm) | 196.0 |
| Lamp | Selenium hollow cathode lamp |
| Slit width (nm) | 0.7 |
| Lamp current (mA) | 290 |
| Injection volume (μL) | 500 |
| Carrier gas and its flow rate (mL/min) | Nitrogen, 150 |
| Reducing agent (%w/v) | NaBH_4 , 0.51 |
| Carrier solution | HCl |
| Carrier-reductant flow (mL/min) | 3.0 |
| Background correction | longitudinal Zeeman-effect |

Table 3. Furnace program for AAS measurements.

| Panel A ^a | | | | |
|----------------------|----------------------------------|----------|----------|---------------------|
| Step | Temperature ($^\circ\text{C}$) | Ramp (s) | Hold (s) | Argon flow (mL/min) |
| 1 | 250 | 1 | 50 | 0 |
| 2 | 250 | 1 | 20 | 250 |
| 3 | 1950 | 0 | 5 | 0 |
| 4 | 2300 | 1 | 3 | 250 |
| Panel B ^b | | | | |
| Prefill | 15 | 100 | 0 | |
| Fill | 15 | 100 | 0 | |
| Fill | 5 | 100 | 80 | |
| Injection | 30 | 0 | 80 | |

^aFIAS flow injection program used for the hydride generation-AAS measurements.

^bPrefill step: FIAS autosampler sampling tube rinsed with simple solution (only done for the first replicate).

Table 4. Recovery studies of Se to some samples of fish.

| Sample | Se content ($\mu\text{g/L}$) | Recovery (%) | Sample | Se content ($\mu\text{g/L}$) | Recovery (%) |
|----------------------------|--------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------------|--------------|
| Salmon | 2.276 ± 0.879 | – | Shrimp | 2.452 ± 0.019 | – |
| Salmon + $2 \mu\text{g/L}$ | 4.449 ± 0.017 | 104 | Shrimp + $2 \mu\text{g/L}$ | 4.388 ± 0.036 | 99 |
| Salmon + $4 \mu\text{g/L}$ | 6.542 ± 0.018 | 104 | Shrimp + $4 \mu\text{g/L}$ | 6.352 ± 0.097 | 98 |
| Turbot | 3.052 ± 0.019 | – | Squid | 2.619 ± 0.003 | – |
| Turbot + $2 \mu\text{g/L}$ | 5.005 ± 0.162 | 99 | Squid + $2 \mu\text{g/L}$ | 4.587 ± 0.033 | 99 |
| Turbot + $4 \mu\text{g/L}$ | 6.766 ± 0.172 | 96 | Squid + $4 \mu\text{g/L}$ | 6.095 ± 0.057 | 92 |

Table 5. Selenium contents in fish purchased in Spanish markets and comparison with literature data (mean \pm standard deviation).

| Sample | Scientific name | Water (%) | Se content ($\mu\text{g/g}$ wet weight) | |
|------------------|----------------------------------|-----------|--|--|
| | | | This study | Others authors |
| Anchovy | <i>Engraulis encrasicolus</i> | 77.9 | 0.245 \pm 0.019 | 0.753 ^a |
| Clam | <i>Chamelea gallina</i> | 80.4 | 0.423 \pm 0.013 | 0.498 ^a |
| Cod | <i>Gadus morhua</i> | 86.0 | 0.125 \pm 0.006 | 0.197 ^b ; 0.270 ^c |
| Cockle | <i>Cerastoderma edule</i> | 84.2 | 0.376 \pm 0.015 | |
| Gilthead | <i>Sparus aurata</i> | 72.3 | 0.122 \pm 0.003 | 0.117 ^d |
| Iridescent shark | <i>Pangasius hypophthalmus</i> | 89.5 | 0.052 \pm 0.004 | |
| Mackerel | <i>Scomber scombrus</i> | 75.6 | 0.638 \pm 0.038 | 0.617 ^e , 0.733 ^a , 0.498 ^f |
| Monkfish | <i>Lophius piscatorius</i> | 83.8 | 0.248 \pm 0.010 | |
| Mussels | <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 81.3 | 0.366 \pm 0.008 | 0.364 ^b ; 0.297 ^b |
| Prawn | <i>Parapenaeus longirostris</i> | 78.6 | 0.382 \pm 0.013 | |
| Salmon | <i>Centrolophus niger</i> | 69.7 | 0.081 \pm 0.003 | 0.244 ^b |
| Sardine | <i>Sardina pilchardus</i> | 74.1 | 0.209 \pm 0.009 | 0.297 ^d , 0.461 ^e , 0.430 ^g , 0.473 ^h , 0.713 ^h |
| Sea bass | <i>Dicentrarchus labrax</i> | 72.7 | 0.132 \pm 0.029 | 0.261 ⁱ |
| Shrimp | <i>Melicertus kerathurus</i> | 76.2 | 0.424 \pm 0.019 | 0.230 ^b ; 0.590 ^c |
| Sole | <i>Solea solea</i> | 81.4 | 0.245 \pm 0.006 | 0.262 ^f |
| Squid | <i>Loligo vulgaris</i> | 85.3 | 0.240 \pm 0.007 | 0.256 ^g , 0.448 ^a |
| Trout | <i>Cyprinus carpio</i> | 77.3 | 0.112 \pm 0.003 | 0.062 ^d , 0.115 ^j |
| Tuna | <i>Thunnus thynnus</i> | 72.7 | 0.523 \pm 0.019 | 0.659 ^a |
| Turbot | <i>Scophthalmus maximus</i> | 74.1 | 0.156 \pm 0.013 | 0.473 ^f |
| Whiting | <i>Merluccius merluccius</i> | 81.4 | 0.254 \pm 0.005 | |

^aChoi et al. (2009); ^bSimonoff et al. (1988); ^cZhang et al. (1993); ^dPappa et al. (2006); ^eGonçalves Ventura et al. (2007); ^fÖnning (2000); ^gCabañero et al. (2005); ^hSatovic et al. (2003); ⁱSatovic et al. (2004); ^jOster & Prellwitz (1989).

the highest Se levels, being a significant source of this element (Pappa et al., 2006). In our study, the total Se content ranged between 0.638 $\mu\text{g/g}$ in mackerel and 0.052 $\mu\text{g/g}$ of iridescent shark (also called panga) (Table 5). Despite the number of fish varieties used in other similar studies of total diet are lower, and expected differences in composition can be found because of the geographical origin of samples, these values are quite similar to mean values of Se concentration found in consumed fish in Slovenia (0.686–0.153 $\mu\text{g/g}$) (Smrkolj et al., 2005) and Argentina (0.243 $\mu\text{g/g}$) (Sigrist et al., 2012).

When comparing the concentration data obtained in the species studied with those reported in scientific literature, similar values are found. Indeed, according to the study of Choi et al., (2009), the species mackerel and tuna presented the highest Se content, with 0.638 $\mu\text{g/g}$ and 0.523 $\mu\text{g/g}$ respectively. Other species having high Se content is sardine (Gonçalves et al., 2007; Satovic et al., 2003). However, in our study this latter species did not present the highest Se content, being these differences probably attributed to the period when the analysis was performed. It has been demonstrated that Se concentration in seafood species, as sardine, mussels and oysters vary considerably with the season when they are captured. The Se levels are notably lower in autumn and higher during spring (Amiard et al., 1993; Satovic et al., 2003). Thus, the low levels than expected found in sardine could be justified because our study was not performed during spring. Notwithstanding, it should be remarked that the fish species catalogued as “fatty or oily fish” living in marine environment showed the highest Se levels, which reinforces the benefit role for health derived from its consumption. It is also shown that consumption of fatty fish has been associated to a lower incidence of chronic diseases in adult population, such as hypertension and hypercholesterolemia, reduced incidences of stroke, heart disease and pre-term delivery (Oomen et al., 2000; Ramel et al., 2010) mainly due to the natural composition of omega-3 fatty acids. To this respect, the presence of high concentrations of antioxidant micronutrients such as Se would produce an additional positive effect.

Beside fatty fish, seafood species (cockle, clam, prawn, shrimp and mussels) presented relatively high Se contents. These results are also in line with other studies, which indicated that crabs

and shellfish contained Se levels significantly higher than other fish species, such as cod or sole (Guns et al., 1992). Similarly, another study of total diet found that, among the analysed foods, the highest Se content was found in shellfish (Zhang et al., 1993). Besides Se, seafood is also rich in iodine and fat-soluble vitamins, but its consumption is also subjected to certain waterborne health risks where such species are found, as the presence of organic pollutants, toxins, parasites and heavy metals (Oehlschlager, 2012). Thus, their consumption should be moderate.

“Lean fish” is a term, in contrast to fatty fish, referred to certain fish species of oceanic origin with an extra dorsal fin. The species belonging to this group such as cod (0.125 $\mu\text{g/g}$), gilthead (0.122 $\mu\text{g/g}$), monkfish (0.248 $\mu\text{g/g}$), sea bass (0.132 $\mu\text{g/g}$), sole (0.245 $\mu\text{g/g}$), turbot (0.156 $\mu\text{g/g}$) and whiting (0.254 $\mu\text{g/g}$) showed a significant lower Se content than fatty fish species ($p = 0.025$), which is in agreement with other related studies (Satovic & Beker, 2004; Satovic et al., 2003). In those studies, the Se content in lean fish species, like sea bass (0.261 $\mu\text{g/g}$) was significantly lower than found in fatty fish species, as pilchard (0.580 $\mu\text{g/g}$).

Finally, fresh water fish, such as trout, salmon and iridescent shark presented the lowest Se content (0.112, 0.081 and 0.052 $\mu\text{g/g}$, respectively). However, this result can be expected because Se content is usually lower in that kind of species than in sea fish (Oster & Prellwitz, 1989). In many cases they have been cultivated in aquaculture sectors where have been fed by commercial diets. Furthermore, seaweed and plankton constitute an excellent source of trace elements, such as Zn, Se and Cu. It is well known that accumulation of Se in seaweeds by three to four orders of magnitude above ambient Se concentrations in seawater represents the major concentrating step in the food chain. Beside this, some seaweed species are capable of accumulating inorganic Se (selenite), and transform in organic Se, which is highly bioavailable, through metabolism processes (Yan et al., 2004). Although Se transfer from seaweeds to herbivore and carnivore fish throughout the food chain, and the influence of the feeding regime of fish on the Se content is out of the scope of the present study, this could justify the low content of this element found in the fresh water fish species analysed.

On the other hand, a non-significant correlation was obtained between the total Se and protein content; in spite of the fact that Se is usually present in the organic form in high-protein foods, mostly in the form of selenocysteine and selenomethionine. A similar result was found in another study (Satovic et al., 2003) in which the correlation coefficient between these two variables (Se and protein content) was as low as 0.340 (Table 6). On the contrary, a negative significant correlation ($p < 0.05$; $r = -0.533$) was obtained between total Se and fat content. This means that Se concentration in a given tissue is inversely proportional to the fat amount, being found associated with body fluids in inorganic form or to proteins in organic form.

Se bioaccessible

As it can be mentioned, fish and seafood contained higher Se concentration than other foods, and therefore, an increased intake of fish could be one way to increase the Se intake among population (Önning, 2000). Nevertheless, while some studies indicate that people having a high fish and seafood intake have an 81% increase in Se levels in plasma (Hagmar et al., 1998) others

show that consumption of this kind of products only produces a slight increase in plasma levels and no increase in glutathione peroxidase or selenoprotein P is observed (Huang et al., 1995). Differences observed can be caused by the different bioavailability of Se species present in fish, among other related factors.

In the present study, two different techniques have been used for the determination of bioaccessibility (solubility and dialyzability). Both techniques simulate an “*in vitro*” gastro-intestinal digestion, similar to that taking place in the human digestive tract (above described in Material and Methods section). The basic principle of the applied techniques lies on the following reasoning: the first step for a specific compound to be absorbed and physiologically used by the organism is to be found in its soluble form. In that case this is named as bioaccessible Se. The difference between solubility and dialyzability assays is related to the distinction in the latter between high and low soluble compounds of molecular weight able to go through semipermeable membrane with a specific pore size. This is the reason why the Se dialyzable fraction is lower than the soluble one.

In our study, soluble and dialyzable Se contents ranged between 0.410–0.024 µg/g and 0.069–0.003 µg/g, respectively (Table 7). The species having the highest bioaccessible Se were those belonging to fatty fish living in marine environment, as mackerel (0.410 and 0.069 µg/g for soluble and dialyzable Se, respectively) and tuna (0.263 µg/g of soluble Se), probably because they also presented the highest amounts of total Se. Indeed, there was a significant correlation ($p < 0.01$; $r = 0.963$) between total Se and soluble Se as well as between total Se and dialyzable Se ($p < 0.01$; $r = 0.955$) for all species studied (Table 6). This result can be justified considering that a high initial content present in fish implies an increased content of soluble or dialyzable Se.

Our results can only be compared with a limited number of data because of the lack of studies dealing with the determination of soluble Se compounds in fish and seafood products (Cabañero et al., 2004; Calatayud et al., 2012; Moreda-Piñeiro et al., 2013; Önning, 2000). For instance, the soluble Se levels found in our samples were much higher than those found by Önning et al., (2000) either in absolute value (0.117–0.068 µg/g) or in percentage (34–23%). However, these differences could be explained

Table 6. Pearson's correlation between variables.

| Element | Factor | <i>p</i> | <i>r</i> |
|-------------------|-------------------|----------|----------|
| Total Se, µg/g | Soluble Se, µg/g | 0.000 | 0.963 |
| | Soluble Se, % | 0.671 | -0.101 |
| | Dialyzed Se, µg/g | 0.000 | 0.955 |
| | Dialyzed Se, % | 0.450 | 0.179 |
| | Protein, g/100 g | 0.142 | 0.340 |
| | Fat, g/100 g | 0.016 | -0.533 |
| | Total Cd, µg/g | 0.016 | -0.803 |
| Soluble Se, µg/g | Dialyzed Se, µg/g | 0.000 | 0.956 |
| | Dialyzed Se, % | 0.239 | 0.276 |
| | Protein, g/100 g | 0.072 | 0.410 |
| | Fat, g/100 g | 0.057 | -0.432 |
| | Total Cd, µg/g | 0.029 | -0.758 |
| Dialyzed Se, µg/g | Protein, g/100 g | 0.324 | 0.233 |
| | Fat, g/100 g | 0.028 | -0.491 |
| | Total Cd, µg/g | 0.061 | -0.684 |

Table 7. Se bioaccessible (soluble and dialyzable) and protein, fat and Cd content of fish samples (wet weight) (mean ± standard deviation).

| Sample | Se bioaccessible | | | | Fat (g/100 g) | Protein (g/100 g) | Cd (µg/g) |
|------------------|------------------|--------------|--------------------|-----------------|---------------|-------------------|---------------|
| | µg Se soluble/g | % Se soluble | µg Se dialyzable/g | % Se dialyzable | | | |
| Anchovy | 0.108 ± 0.015 | 44.0 | 0.020 ± 0.001 | 8.0 | 0.53 ± 0.10 | 16.39 ± 0.70 | nd |
| Clam | 0.195 ± 0.016 | 46.0 | 0.043 ± 0.003 | 10.1 | 0.61 ± 0.30 | 9.28 ± 0.40 | 0.054 ± 0.006 |
| Cod | 0.058 ± 0.006 | 46.1 | 0.009 ± 0.001 | 6.9 | 0.08 ± 0.10 | 11.41 ± 0.60 | nd |
| Cockle | 0.178 ± 0.028 | 47.4 | 0.043 ± 0.003 | 11.5 | 0.63 ± 0.20 | 9.58 ± 0.40 | 0.046 ± 0.006 |
| Gilthead | 0.066 ± 0.008 | 54.4 | 0.011 ± 0.001 | 8.6 | 5.78 ± 1.10 | 18.96 ± 0.50 | nd |
| Iridescent shark | 0.024 ± 0.003 | 45.8 | 0.003 ± 0.001 | 6.2 | 0.58 ± 0.20 | 7.42 ± 0.10 | nd |
| Mackerel | 0.410 ± 0.034 | 64.2 | 0.069 ± 0.001 | 10.9 | 0.24 ± 0.20 | 20.05 ± 0.70 | nd |
| Monkfish | 0.127 ± 0.030 | 51.1 | 0.027 ± 0.001 | 10.9 | 0.44 ± 0.20 | 13.42 ± 0.70 | 0.050 ± 0.005 |
| Mussel | 0.174 ± 0.008 | 47.5 | 0.046 ± 0.001 | 12.5 | 1.35 ± 0.10 | 10.75 ± 0.60 | 0.122 ± 0.020 |
| Prawn | 0.249 ± 0.010 | 65.2 | 0.050 ± 0.006 | 13.2 | 0.54 ± 0.10 | 17.49 ± 0.70 | 0.032 ± 0.006 |
| Squid | 0.147 ± 0.005 | 61.0 | 0.036 ± 0.002 | 14.9 | 0.77 ± 0.10 | 11.19 ± 0.60 | 0.202 ± 0.030 |
| Salmon | 0.068 ± 0.001 | 83.8 | 0.010 ± 0.001 | 12.0 | 11.73 ± 1.10 | 16.39 ± 0.80 | nd |
| Sardine | 0.106 ± 0.009 | 50.6 | 0.021 ± 0.002 | 10.0 | 5.72 ± 0.40 | 13.61 ± 0.40 | nd |
| Shrimp | 0.218 ± 0.027 | 51.5 | 0.046 ± 0.004 | 10.9 | 0.67 ± 0.30 | 19.63 ± 0.90 | 0.060 ± 0.005 |
| Sole | 0.106 ± 0.010 | 43.4 | 0.023 ± 0.001 | 9.2 | 0.67 ± 0.10 | 15.19 ± 0.70 | nd |
| Sea bass | 0.078 ± 0.010 | 58.7 | 0.014 ± 0.001 | 10.9 | 6.38 ± 0.20 | 17.85 ± 0.80 | nd |
| Turbot | 0.095 ± 0.019 | 60.8 | 0.019 ± 0.003 | 12.3 | 5.78 ± 0.90 | 13.15 ± 0.70 | nd |
| Tuna | 0.263 ± 0.031 | 50.4 | 0.043 ± 0.005 | 8.3 | 0.38 ± 0.10 | 23.23 ± 0.70 | nd |
| Trout | 0.064 ± 0.007 | 57.3 | 0.013 ± 0.002 | 11.9 | 3.58 ± 0.50 | 16.22 ± 0.70 | 0.250 ± 0.040 |
| Whiting | 0.133 ± 0.008 | 52.2 | 0.027 ± 0.002 | 10.6 | 0.32 ± 0.10 | 16.06 ± 0.70 | nd |

nd: not detectable.

because in that study, an extraction procedure of fish samples with a buffer solution (20 mM Tris-HCl and ammonium acetate) was followed together with a subsequent centrifugation, instead of the “*in vitro*” digestion process used in our study. It must be mentioned that bioaccessibility test are affected by the simulated gastrointestinal conditions used when performing the experiments. The work by Cabañero et al. (2004) used a similar simulated gastric process and intestinal digestion to the one applied in our study to determine Se bioaccessibility in fish. They reported similar values to those found in our study for tuna (0.244 µg/g) and higher contents for sardine (1.011 µg/g), the soluble Se percentages being also quite similar (83–50%). However, the number of fish species analyzed in that study (tuna, swordfish, and sardine) was small compared to our study hence further comparisons cannot be established.

In according to our data, in contrast to the fatty fish species such as tune and mackerel, we can find other “lean fish” species, gilthead (0.066 µg/g), cod (0.058 µg/g) and freshwater fishes such as salmon (0.068 µg/g), trout (0.064 µg/g) and panga (0.024 µg/g), which presented the lowest soluble Se contents. However, for all studied species, Se solubility ranged between 84–43% showing a relatively high Se bioavailability. These results are in accordance with those reported by Calatayud et al. (2012), where Se bioaccessibility, expressed as solubility, ranged between 105–39% for a wide variety of seafood products.

The gastric digestion procedure above described implies a protein disruption into lower molecular weight peptides through the action of proteinases and peptidases (Cabañero et al., 2004; Önnings, 2000). This explains that most Se being solubilized is able to go through a semipermeable membrane with a determined pore size, which is shown by the significant correlation between soluble Se and dialyzable Se obtained ($p < 0.01$; $r = 0.956$). Once again, mackerel presented the highest content of dialyzable Se (0.069 µg/g), while freshwater fish species the lowest one (around 0.010 µg/g). Nevertheless, the percentage of dialyzable Se for all fish species studied only ranged between 14.9–6.2% of the content initially presented, which points out that fish is not a good source of bioaccessible Se according to its dialyzability, especially for some of the species tested. Similar results have been obtained by Moreda-Piñero et al. (2013) where the dialyzability of Se in white fish, cold water fish and mollusk ranged from 4.0 to 13%. These authors concluded that Se is highly solubility but it is not easily dialyzed from fish and mollusk.

Differences encountered in bioaccessible Se for the studied fish species might be due to differences in the composition of the fish, since proteins and fat content may affect the solubility of Se (Cabañero et al., 2004). However, in our study a non-significant correlation between bioaccessible Se (soluble or dialyzable) and protein content was obtained. The same as what was seen for total Se, and contrary to what was expected, the presence of a major content of protein content did not improve Se bioaccessibility, despite Se is usually found in fish in organic form bound to low molecular weight peptides remaining after enzymatic digestion.

On the other hand, a significant correlation between dialyzable Se and fat content ($p < 0.05$; $r = -0.491$) was observed which implies a lower dialyzability of Se as fat content increases in fish (Table 6). Probably, a higher fat amount could have interfered with the enzymes capacity of the “*in vitro*” method to release the Se present in low molecular weight peptide samples, easy to be dialyzed.

Finally, Se bioavailability also decreases in presence of heavy metals as Hg, Cd and Tl because of the formation of selenides, highly insoluble, which contributes to keep these metals biologically unavailable (Eisler, 1999). This fact has a major limitation, such as a lower assimilation of Se initially present in the food, but could lead a beneficial effect as a protective role

of Se against these heavy metals, which the main exposure source to humans is through ingestion of foods, specially fish. Interactions between Se-Hg have been sufficiently described in literature (Burger et al., 2013; Calatayud et al., 2012; Kaneko & Ralston, 2007); in contrast, those between Se-Cd have been scarcely investigated. In our study, only a reduced number of fish species presented detectable Cd levels (Table 7), however, a significant correlation between soluble Se and Cd content ($p < 0.05$; $r = -0.758$) and Cd content and Se content ($p < 0.05$; $r = -0.803$) was shown. This correlation was negative, indicating that a higher Cd content in the fish produced a lower Se bioaccessibility. These results are in agreement with a previous study (Pappas et al., 2011) in which the organic Se added at several concentrations, from 0.15 up to 3 mg/kg could reduce the tissue deposition of the low Cd concentrations because bioavailability of both elements decreases. Likewise, “*in vivo*” studies (Feroci et al., 2005) have also shown these interactions between Se and Cd and other elements by means of the formation of complexes or salts, either insoluble or poorly soluble in water. However, this will also depend on the chemical form in which Se is present as well as the ratio Se/Cd. In our study, a ratio ranging between 12–0.5 produced a decrease in the solubility of the essential trace element.

Conclusions

In the present work, total and bioaccessible Se have been determined in an ample gamma of seafood products widely consumed in Spain and Mediterranean countries with the aim of assessing if this food commodity is a good source of this element. Results showed that both fatty fish and shellfish had a relatively high Se content. Consumption of 100 g of this type of food commodity would help to meet with nearly 100% the DRI established for this element (55 µg/day), which is commendable for fatty fish though in less extent for shellfish due to its content in heavy metals like Cd. On the contrary, the species of lean fish and particularly the species of freshwater fish showed significantly lower Se contents. These differences could be attributed to the concentrations of this micronutrient in marine environment. In spite of Se is mainly found bound to proteins, no correlation was observed between protein content and Se content in the studied fish species.

With regard to bioaccessibility, species of fatty fish and shellfish showed the highest soluble and dialyzable Se content, while many species of lean fish and particularly freshwater fish (i.e. salmon, trout and panga) obtained the lowest bioaccessible Se contents. The most part of the initially present Se content was solubilized with percentages between 43–84% but if only the dialyzed Se content is considered as bioaccessibility criterion, this percentage did not exceed 15%. In fact coupled with the low Se content present in species of lean fish and freshwater fish make these foods are not a good source of bioaccessible Se. With relation to species of fatty fish and shellfish, further research is need in order to clarify if they are good dietary sources of Se in spite of the relatively high-content of this micronutrient. Similar to the above case, non-significant correlation was observed between protein and soluble or dialyzable Se content. However, a significant negative correlation was observed for fat content and bioaccessible Se. Likewise, the presence of a heavy metal like Cd also reduced Se bioaccessibility, demonstrating a negative interaction between both elements, and highlighting the protector role of Se against the toxicity of Cd.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

References

- Amiard JC, Berthet B, Bontaghou S. 1993. Seasonal selenium variations in mussels and oysters from a French marine farm. *J Food Compos Anal* 6:370-380.
- AOAC International. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg (MD): AOAC International.
- Berr C, Akbaraly T, Arnaud J, Hininger I, Roussel AM, Gateau P. 2009. Increased selenium intake in elderly high fish consumers may account for health benefits previously ascribed to omega-3 fatty acids. *J Nutr Health Aging* 13:14-18.
- Burger J, Jeitner C, Donio M, Pittfield T, Gochfeld M. 2013. Mercury and selenium levels, and selenium: mercury molar ratios of brain, muscle and other tissues in bluefish (*Pomatomus saltatrix*) from New Jersey, USA. *Sci Total Environ* 443:278-286.
- Burk RF, Hill KF, Motley AK, Austin LM, Norsworthy BK. 2006. Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1789-1793.
- Cabañero AI, Carvalho C, Madrid Y, Batoréu C, Cámara C. 2005. Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. *Biol Trace Elem Res* 103:17-35.
- Cabañero AI, Madrid Y, Cámara C. 2004. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro method. *Anal Chim Acta* 526:51-61.
- Calatayud M, Devesa V, Virseda JR, Barberá R, Montoro R, Vélez D. 2012. Mercury and selenium in fish and shellfish: occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 50: 2696-2702.
- Cámara F, Amaro, MA, Barberá R, Clemente G. 2005. Bioaccessibility of minerals in school meals: comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chem* 92:481-489.
- Choi MK, Kang MH, Kim, MH. 2009. The analysis of copper, selenium and molybdenum contents in frequently consumed foods and an estimation of their daily intake in Korean adults. *Biol Trace Elem Res* 128:104-117.
- Combs GF, Combs SB. 1986. The role of selenium in nutrition. New York: Academic Press.
- Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 385: 1304-1323.
- Eisler R. 1999. Mercury hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Contaminant Hazard Reviews, Report 10, USGS/BSR-1999-0002.
- Fairweather-Tait SJ. 1997. Bioavailability of selenium. *Eur J Clin Nutr* 51:20-23.
- Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. 2010. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr* 91:1484S-1491.
- Feroci G, Badiello R, Fini A. 2005. Interactions between different selenium compounds and zinc, cadmium and mercury. *J Trace Elem Med Biol* 18:227-234.
- Finley JW. 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutr Rev* 64: 146-151.
- Fisher Wilson J. 2004. Balancing the risks and benefits of fish consumption. *Annals of Internal Medicine* 141:977-980.
- Gonçalves Ventura M, Carmo Freitas M, Pacheco A, van Meerten T, Wolterbeek HT. 2007. Selenium content in selected Portuguese foodstuffs. *Eur Food Res Technol* 224:395-401.
- Guns DM, van Hoeyweghen P, Vyncke W, de Clerk R. 1992. Trace metals in cut trough shell from Belgian coastal waters. *Rev Agr* 45:731-739.
- Hagmar L, Persson-Mochoss M, Akkesson B, Schültz A. 1998. Plasma levels of selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase and their correlation to fish intake and serum levels of thyrotropin and thyroid hormones: a study on Latvian fish consumers. *Eur J Clin Nutr* 52:796-800.
- Hartikainen H. 2005. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol* 18: 309-318.
- Hill KE, Zhou J, Austin LM, Motley AK, Ham AJ, Olson GE, Atkins JF, et al. 2007. The selenium-rich-C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for supply of selenium to brain and testis but not for maintenance of whole-body selenium. *J Biol Chem* 282:10972-10980.
- Huang W, Akkesson B, Svensson BG, Schültz A, Burk RF, Skeverfving S. 1995. Selenoprotein P and glutathione peroxidase in plasma as indices of selenium status in relation to the intake if fish. *Br J Nutr* 73: 455-461.
- Intawongse M, Dean JR. 2006. In vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *Trends Anal Chem* 25:876-886.
- Juhász AL, Smith E, Weber J, Rees M, Roß A, Kuchel T, Sansom L, Naidu R. 2007. Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils. *Chemosphere* 69:961-966.
- Kaneko JJ, Ralston NV. 2007. Selenium and mercury in pelagic fish in the Central North Pacific near Hawaii. *Biol Trace Elem Res* 119: 242-254.
- Levander OA. 1987. Assessing the bioavailability of selenium in foods. In: Combs GF Jr, Levander OA, Spallholz JE, Oldfield JE, editors. Selenium in biology and medicine. New York: AVI Books. p 403-412.
- Martín Cerdeño VJ. 2010. Consumo de pescado en España: diferencias en función de las características del consumidor. Available at: http://www.mercasa.es/files/multimedios/Consumo_de_pescado.pdf. Accessed on 04 April 2014.
- Marval-León JR, Cámara-Martos F, Pérez-Rodríguez F, Amaro-López MA, Moreno-Rojas R. 2012. Optimization of Selenium determination based on the HG-ET-AAS method for its application to different food matrices. *Food Anal Methods* 5: 1054-1061.
- Moreno-Frías J, Moreno-Frías A, Román-Hortas V, Domínguez-González R, Alonso-Rodríguez E, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, et al. 2013. In vitro bioavailability of total selenium and selenium species from seafood. *Food Chem* 139: 872-877.
- Oehlenschläger J. 2012. Seafood: nutritional benefits and risk aspects. *Int J Vitam Res* 82:168-176.
- Önning G. 2000. Separation of soluble selenium compounds in different fish species. *Food Chem* 68:133-139.
- Oomen CM, Feskens EJM, Räsänen L, Fidanza F, Nissinen AM, Menotti A. 2000. Fish consumption and coronary heart disease mortality in Finland, Italy and the Netherlands. *Am J Epidemiol* 151: 999-1006.
- Oster O, Prellwitz W. 1989. The daily dietary selenium intake of West German adults. *Biol Trace Elem Res* 20:1-14.
- Pappa EC, Pappas AC, Surai PF. 2006. Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. *Sci Total Environ* 372:100-108.
- Pappas AC, Zoidis E, Georgiou CA, Demiris N, Surai PF, Fegeros K. 2011. Influence of organic selenium supplementation on the accumulation of toxic and essential trace elements involved in the antioxidant system of chicken. *Food Addit Contam Part A* 28:446-454.
- Presser TS, Sylvester MA, Low WH. 1994. Bioaccumulation of selenium from natural geologic sources in the Western States and its potential consequences. *Environ Manage* 18:423-436.
- Ramel A, Martínez JA, Kiely M, Bandarra NM, Thorsdottir I. 2010. Effects of weight loss and seafood consumption on inflammation parameters in young, overweight and obese European men and women during 8 weeks of energy restriction. *Eur J Clin Nutr* 64: 987-993.
- Rayman MP. 2000. The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356:233-241.
- Satovic V, Beker D. 2004. Selenium content in sea bass of the Adriatic Sea. *Eur Food Res Technol* 218:111-113.
- Satovic V, Beker D, Gumhalter-Karolyi L. 2003. Selenium content in the pilchard of the Adriatic Sea. *Eur Food Res Technol* 217:154-156.
- SCF, Scientific Committee on Food. 2000. Opinion of the scientific committee of food of the tolerable upper intake level of selenium. *SCF/CS/NUT/UPPLEV/25 Final*:1-18.
- Sigrist M, Brusa L, Campagnoli D, Beldoménico H. 2012. Determination of selenium in selected food samples from Argentina and estimation of their contribution to the Se dietary intake. *Food Chem* 134: 1932-1937.
- Simonoff M, Hamon C, Moretto P, Llabador Y, Simonoff G. 1988. Selenium in Foods in France. *J Food Compos Anal* 1:295-302.
- Smith KM, Sahyoun NR. 2005. Fish consumption: recommendations versus advisories, can they be reconciled? *Nutr Rev* 63:35-45.
- Smrkolj P, Pograjc L, Hlastan-Ribic C, Stibilj V. 2005. Selenium content in selected Slovenian foodstuffs and estimated daily intakes of selenium. *Food Chem* 90:691-697.

DOI: 10.3109/09637486.2014.908173

Bioaccessibility and content of Se in sea food 685

- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother* 57:134–144.
- Thiry C, Ruttens A, De Temmerman L, Schneider YJ, Pussemier L. 2012. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chem* 130:767–784.
- Thompson CD. 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr* 58:391–402.
- USDA, United States Department of Agriculture. 2011a. Dietary Reference Intakes: RDA and AI for vitamins and Elements. Available at: http://iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/RDA%20and%20AIs_Vitamin%20and%20Elements.pdf. Accessed on 04 April 2014.
- USDA, United States Department of Agriculture. 2011b. UL for vitamins and Elements. Available at: <http://iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/ULs%20for%20Vitamins%20and%20Elements.pdf>. Accessed on 04 April 2014.
- Yan X, Zheng L, Chen H, Lin W, Zhang W. 2004. Enriched accumulation and biotransformation of selenium in the edible seaweed *Laminaria japonica*. *J Agric Food Chem* 52:6460–6464.
- Zhang X, Shi B, Spallholz JE. 1993. The selenium content of selected meats, seafoods, and vegetables from Lubbock, Texas. *Biol Trace Elem Res* 39:161–169.

VI.3. SELENIUM BIOAVAILABILITY IN FOODS: THE ROLE OF SPECIATION AND INTERACTION WITH OTHER DIETARY COMPONENTS

Nova Science Publishers:

Selenium: Dietary Sources, Properties and Role in Human Health (ebook)

by Wanda Morrison (Editor)

Pub. Date: 2015

ISBN: 978-1-63483-718-7

Chapter 1

Selenium Bioavailability in Foods: The Role of Speciation and Interaction with Other Dietary Components

F. Cámara-Martos^{*}, J. Marval – León and R. Moreno - Rojas

Department of Food Science and Nutrition. University of Cordoba, Cordoba (Spain)

1.1. Abstract.

Selenium is an important micronutrient in humans and animals, despite its toxicity at high concentrations, as it is part of the active site of glutathione peroxidase. Furthermore, this element is also component of selenoprotein P and iodothyronine deiodinases, enzymes related in the activation and deactivation of thyroid hormones. Although selenium can only be obtained through diet, determination of the total selenium content in foodstuffs could be misleading. It is much more appropriate to know the amount of selenium present in the food that is actually absorbed and therefore capable of being used by the body; i.e the bioavailability. There are several factors influencing this bioavailability such as chemical form (selenium speciation) and dietary factors. The present chapter intends to perform a thorough review of selenium bioavailability in foodstuffs and human diet.

1.2. The Physiological Role of Selenium

Selenium is an essential micronutrient which is required at small levels by humans and animals. This micronutrient plays an important role in several physiological functions such as forming part of the glutathione peroxidase (Burk et al., 1999), the thioredoxin reductase (Madeja et al., 2005) and the iodothyronine-5 deiodinases (Merian et al., 2004). However, selenium may also be toxic for many organisms when presented at high concentrations being one of the chemical elements in which there is less difference between essential and toxic levels. The selenium content in animal tissues reflects that of the food that they consume. It is

^{*}Corresponding author: Prof. Fernando Cámara – Martos, PhD. e-mail: bt2camaf@uco.es; Phone: +34 957 21 20 00.

precisely for that reason that the dietary intake of selenium throughout the world's population is so variable and depends on the levels of this element present in the soil in which the foods consumed are produced. The geographical distribution of selenium in soils is very uneven, ranging from almost zero to up to 1250 mg/Kg in some seleniferous soils in Ireland.

Once it has been ingested, selenium absorption mostly takes place at the lower end of the small intestine, and both its organic and inorganic forms are absorbed. However, as we shall see throughout this chapter, its organic forms, such as selenomethionine, are more efficiently absorbed than the inorganic ones, particularly selenite (Stewart et al., 1987). The transport mechanism used by the dietary selenium to traverse the intestinal membrane is not clear. Selenate seems to be absorbed via sodium-dependent active transport, shared with sulphur, whereas selenite uses passive diffusion (Fairweather – Tait, 1997). These inorganic forms of selenium compete with those of sulphur for their absorption, one of the multiple interactions which takes place between both elements. On the contrary, selenomethionine is absorbed by sodium-dependent active transport, using the same transporter as the methionine (Schrauzer, 2000).

Once it has been absorbed, selenium binds, in principle, to albumen, which transports the element to the liver (Suzuki et al., 2009). Once there, the selenium is released and serves as a synthesis of selenoproteins, principally selenoprotein P. The latter is released into the bloodstream and transports the selenium between the liver and other organs and tissues. The main selenium-accumulating organs are the liver, followed by the kidneys. In those two organs most of the selenoproteins are synthesized, especially selenoprotein P and cellular glutathione peroxidase in the liver and extracellular glutathione peroxidase in the kidneys (Suzuki et al., 2009). Other organs which also accumulate selenium are blood, erythrocytes, fat, muscle, pancreas, skeleton and spleen (Stahl et al., 2002).

The main selenium excretion route in humans is by urine in the form of selenosugar. The amount of selenium excreted therefore depends on the selenium ingested. When the latter is low, less than half of its intake through diet is excreted, while if it is high, selenium excretion increases. Hence the importance of renal regulation in the homeostasis of this element. Similarly, the selenium excreted in faeces is made up of dietary selenium not absorbed in the intestine and that secreted endogenously by the organism, present in biliar, pancreatic and intestinal secretions. It is thought that the secretion of selenium in bile and its enterohepatic reabsorption may constitute a mechanism, in addition to renal control, for the maintenance of the body selenium reserves (Dreosti, 1986). Finally, when there is a high intake of selenium, methylated forms can also be excreted, either in urine (as trimethylselenonium ion or as methylselenol), or by breathing (as dimethylselenide) leading to a characteristic odour of garlic on the breath (Suzuki et al., 2006 a y b).

1.3. Selenium in Soils

As indicated, there are several regions worldwide that have a generally insufficient selenium content in the environment, mainly in soils (< 0.125 mg/Kg), such as New Zealand, Finland, Sweden and central China, or which is not readily available to plants (United Kingdom) (Fordyce et al., 2010; Tolu et al., 2014; Wang et al., 2012). Others, on the contrary, have excessively high selenium concentrations (> 1 mg/Kg) such as some areas of China (Enshi and Ziyang regions), Ireland, North America (South Dakota), India (Punjab) and several regions of Mexico (Gerla et al., 2011; Sharma et al., 2009; Tolu et al., 2014; Zhu et al., 2009). Leaching of this high content of selenium may impair (sub) surface waters causing damage to the environment and human health. Thus, soils containing more than 3 mg/Kg total selenium can be defined as being excessive for human nutrition (Hawkesford and Zhao, 2007).

Selenium concentrations are particularly high in soils derived from cretaceous shales in semi – arid and arid regions (Spadoni et al., 2007), and they have also closely related to sulphur. In fact, high selenium concentrations have been found in soils of volcanic sulphur deposits. This interaction and association with an element with similar characteristics like sulphur is produced at different levels. Selenium in the form of selenate(SeO_4^{2-}) can be adsorbed by clays (Belzile et al., 2000), although this sorption can be mitigated in the presence of sulphate due to competition for absorption sites (Gerla et al., 2011; Belzile et al., 2000). Similarly, selenate may replace sulphate in the open lattice of several sulphate minerals such as epsomite[$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$], mirabilite[$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$], bloedite[$\text{Na}_2\text{Mg}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], thenardite[Na_2SO_4], hexahydrite[$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] and some metal sulfides (Gerla et al., 2011; Presser and Swain, 1990). Selenium, mainly in the form of selenite (SeO_3^{2-}), can also be absorbed by clay minerals, organic matter, iron oxides and other similar metal hydroxides. It can be affirmed that the two forms of inorganic selenium most abundant in soils and water are selenite and selenate (Pyrzynska, 1998). The availability of this inorganic selenium from the plant diminishes as the organic matter content in the soil increases (De Temmerman et al. 2014). Low concentrations of soluble selenium in organic rich soils (Jacobs, 1989) have been found. Finally, selenium concentration in soils generally increases with depth.

As well as the content of total selenium present in soils, its accumulation and uptake by the plants depends on its chemical form. Thus, the existing forms and bioavailability of selenium in soils play decisive roles in its geochemical cycle (Yu et al., 2014). Inorganic selenium can occur in different oxidation states (-2, 0, 4 and 6). Within these inorganic forms, elemental selenium (Se^0), which can be obtained by microbial and abiotic reduction of oxidized forms, has a low bioavailability due to its poor solubility and low mobility. The lowest oxidation

state (Se^{-2}) is found as insoluble selenide minerals and organic selenium compounds formed by biotic reduction (Quin et al., 2012; Lenz and Lens, 2009; Lenz et al., 2008). The highest state of oxidation is selenate or Se^{+6} which is highly bioavailable, water soluble and mobile. Selenate is uptaken by the roots of plants, in competition with sulphur, due to the existence of a sulfate transporter located in the root plasma membrane (Terry et al., 2000; Arvy, 1993). In contrast, selenite transport does not appear to require the use of a sulphur transporter. As already mentioned, selenite (or Se^{+4}) and hydroselenite species generally tend to absorb to the surfaces of organic matter and metal hydroxides and for that reason they are less bioavailable than selenate. It is still not clear if selenite uptake by the plant roots is done in an active or passive transport form (Zhu et al., 2009; Terry et al., 2000). Finally, inorganic selenium compounds can be transformed into volatile compounds such as dimethylselenide (DMSe) and dimethyldiselenide (DMDSe) through microbial action of fungi, plants and animals. The biomethylation processes could be considered as being a detoxification mechanism since these methylated forms are less toxic than the inorganic forms of selenium (Pyrzynska, 1998).

1.4. Selenium in Plants

Along with the inorganic forms of selenium previously described, there is a series of organic forms (organoselenium compounds), generally produced by biological reduction of oxidized forms (Tolu et al., 2011). In plants, inorganic selenium uptake by the roots is reduced to selenide in the leaf chloroplasts in a series of both enzymatic and nonenzymatic reactions, via glutathione (GSH) and the intermediate compound selenodiglutathione (see Figure 1). Selenide can be converted into selenocysteine by coupling with *o* – acetylserine and then non specifically incorporated into proteins (Ng and Anderson, 1979). Selenocysteine can also be metabolized to selenomethionine by means of its prior conversion into selenocystathionine and selenohomocysteine as intermediate metabolites. This selenomethionine can also replace methionine in the formation of proteins, mainly in cereals and forage crops, because tRNA does not discriminate between methionine and selenomethionine (Schrauzer, 2000).

Once synthesized, selenomethionine can be methylated (Figure 1), in an enzymatic reaction that apparently occurs in the cytosol, and converted into dimethylselenide and then volatilized (Tagmount et al., 2002). The conversion of methyl - selenomethionine into dimethylselenide is probably catalyzed by S – methylmethionine hydrolase (Ellis and Salt, 2003). Since roots volatilize selenium faster than other tissues, dimethylselenide precursors, which are synthesized in chloroplasts, have to be transported downwards from the leaves for this to occur (Zayed and Terry, 1994)

Selenocysteine can also undergo methylation producing methyl – selenocysteine (Figure 1). In the same way as methionine, this methylation process has been shown as being one of the prerequisites of plants for accumulating selenium under less toxic forms, allowing plants to survive in seleniferous soils (Mapelli et al., 2011; Neuhierl et al., 1999). Thus, methyl - selenocysteine is the major selenocompound in selenium enriched plants such as garlic, onions, broccoli, sprouts and wild leeks (Whanger, 2002). The methylation is produced by the presence of a methyltransferase which specifically methylates selenocysteine using S – adenosyl – methionine or methyl – methionine as methyl donors (Lyi et al., 2005; Neuhierl et al., 1999). This inorganic form of selenium together with a product of it like γ - glutamyl – methyl – selenocysteine (γ - glut – MeSeCys) are the principal selenocompounds in “selenium – accumulator plants” (belonging to *Brassica* and *Allium* families), which can tolerate selenium concentrations of up to 1000 times higher than usual plants (Dumont et al., 2006).

Another aspect of the selenium-sulphur interactions in the soil – plant system is that which affects the production of glucosinolates. From a chemical viewpoint glucosinolates are β - thioglycosides - N – hydroxysulfates with a non glycosylated side chain. They are present in a wide variety of *Brassicaceae* genus plants like mustard, cabbage and horseradish. The interest in this type of substances and their hydrolysis products lies in their anti-cancerigenous properties. In fact, it has been observed that selenium can regulate the metabolism of glucosinolates and their hydrolysis products. Its similar chemical characteristics to sulphur makes it accumulate in *Brassicaceae* genus species following the same assimilation mechanism as the sulphur that it replaces. Charron et al. (2001) showed how an increase in selenium levels in *Brassica oleracea* diminishes the total content of glucosinolates. The addition of different concentrations of sodium selenate (0 – 9 mg/L) to hydroponic solutions in which the plants grew decreased the concentration of glucosinolates from 5.84 $\mu\text{mol/g}$ (control) to 1.90 $\mu\text{mol/g}$ (for the highest concentration of selenate). A similar study (Toler et al. 2007) also found this decline in glucosinolate production, in some cases of 68%, when *Brassica oleraceae* species were treated with concentrations of sodium selenate of between 0 – 1.5 mg/L.

As expected, Barickman et al. (2013) reported that this fall in glucosinolate also entailed a 63.6% decrease in the production of isothiocyanates when the selenium concentrations increased from 0 to 3.2 mg/L. The synthesis of selenoaminoacids and their incorporation into the proteins adversely affects the synthesis of glucosinolates and their metabolism (Bangarwa et al., 2011; Traka and Milten, 2009; Gimsing and Kikegaard, 2009). This effect is not observed when plants are treated at the same time with sulphur, so that according to these authors (Barickman et al. 2013) the most beneficial treatment is the combination of selenate and sulphur since it permits one to increase the selenium concentrations without diminishing glucosinolate production.

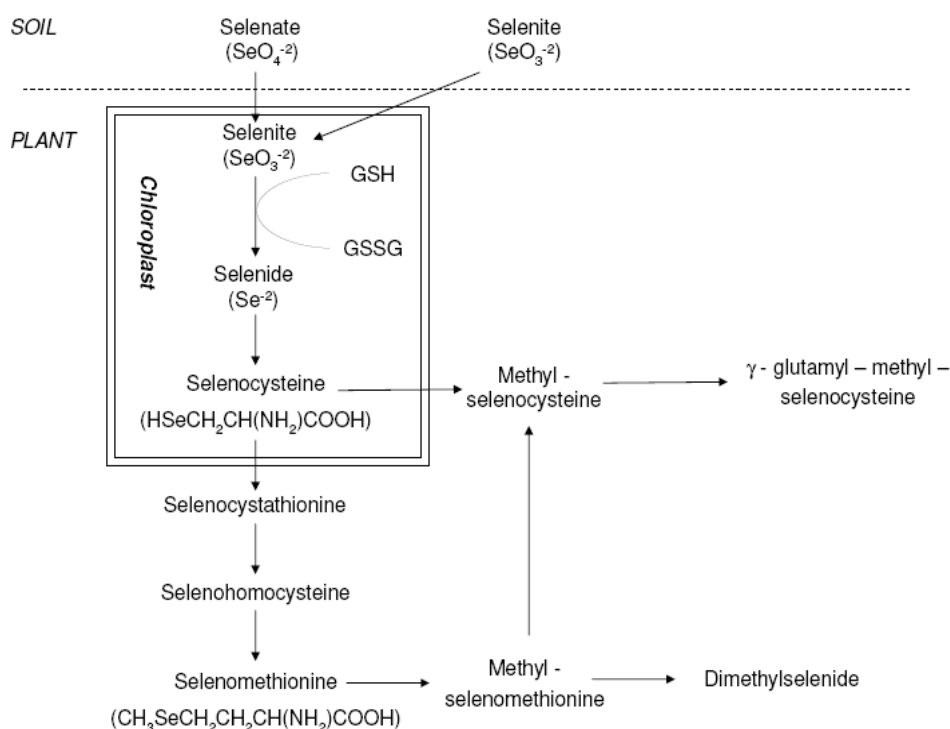


Figure 1. Organoselenium compounds biosynthesis in plants.

1.5. Selenium in Diets. The Concept of Bioavailability

Selenium concentration in foods mainly depends on the content of this element in the soil where the animal was raised or the plant was grown (Hartikainen, 2005). Thus, once soil selenium has been uptaken and transformed by plants, it enters the food chain through them or through the animals which eat these plants. Meat products contain exclusively organic selenium (Bierla et al., 2008). As already seen, these organic selenium species may also be found in plants; however, mushrooms, cereals and some vegetables exposed to high concentrations of selenate or selenite, can also present inorganic selenium in their composition (Cubadda et al., 2010; Pedrero et al., 2006; Stefanka et al., 2001)

There have been several studies determining the total selenium content present in foodstuffs and diets since this is the only way of providing our body with this element (Choi et al., 2009; Pappa et al., 2006; Satovic and Beker, 2004). However, it is much more interesting from a nutritional point of view to know selenium bioavailability. Bioavailability can be defined as being the micronutrient fraction originally present in the food, which is solubilized and absorbed in the intestinal lumen, metabolized by typical routes, and finally used for typical physiological functions or deposited in storage compounds (Cámara – Martos et al., 2011).

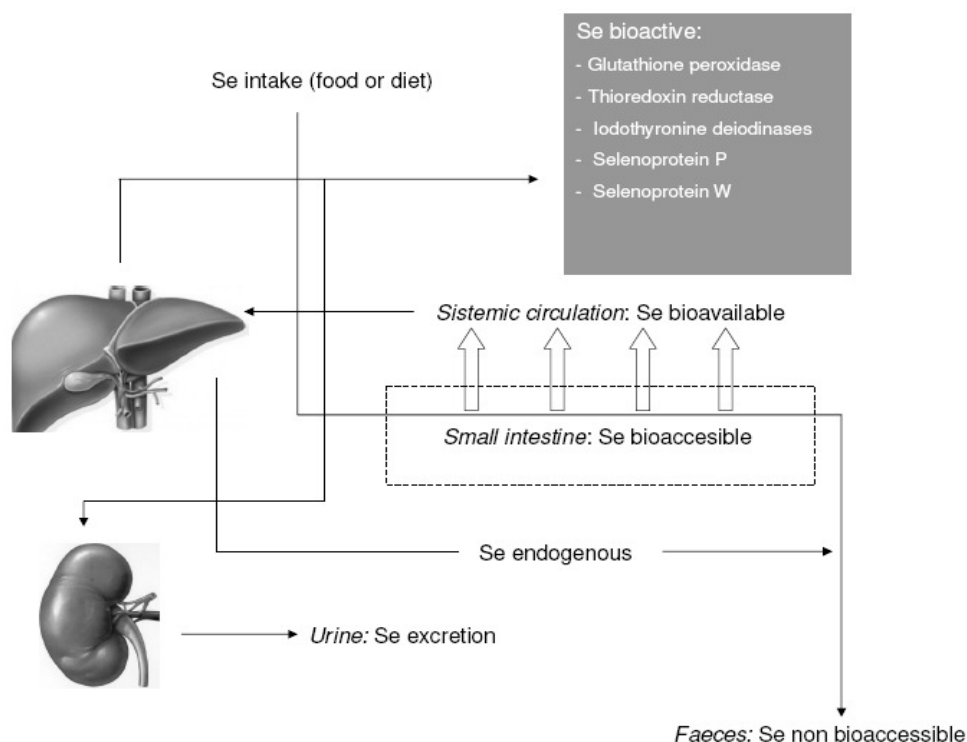


Figure 2. Different fractions of selenium ingested of in vitro and in vivo bioavailability studies.

It is a wide and complex concept that involves several stages. Firstly, availability in the intestinal lumen for absorption, which means that selenium must be in a soluble state. In contrast, non-solubilized selenium cannot be absorbed through the intestinal membrane and is directly excreted without having affected the body's mechanism. Currently, this process is known by the term bioaccessibility to differentiate it from bioavailability itself. On the other hand, a bioavailable fraction is the fraction of element which is absorbed or retained by the organism reaching the systemic circulation. Finally, some authors (Thiry et al., 2012) within the term bioavailability have defined the concept of bioactivity as being that selenium fraction which is converted into biologically active selenometabolites to be incorporated into organs and tissues (see Figure 2).

Selenium bioaccessibility can be determined by *in vitro* studies. These studies are based on a simulated gastrointestinal food digestion formed by a gastric phase with pepsin-HCl at pH 2, and later by an intestinal phase with pancreatin-bile salts. Finally, the digest is centrifuged (Cámara et al., 2005; Sahuquillo et al. 2003) and a soluble selenium fraction is determined as the amount of selenium present in the supernatant (see Figure 3).

The incorporation of a dialysis membrane of a certain pore size during the intestinal phase of this simulated gastrointestinal digestion process gives rise to other types of bioaccessibility assays, those based on dialyzability. It is thus aimed

to simulate a similar passive diffusion process to that which would take place in the intestinal mucous (Cámara et al., 2005). Additionally, as opposed to the previous bioaccessibility assays based on solubility, this would permit us to distinguish between soluble compounds of high and low molecular weights.

As an attempt to advance further in *in vitro* studies to estimate mineral bioavailability, over the last few years, cell cultures have been incorporated which enable the estimation of the micronutrient uptake and transport. The model which incorporates cell lineage should present similar characteristics to enterocytes regarding permeability and formation of a polarized barrier. Thus, the Caco-2 cell lineage is the most promising and versatile cell culture for this purpose (Cámara – Martos et al., 2011).

This cell lineage is usually used in combination with the solubility and dialyzability tests previously mentioned (Calatayud et al., 2012; García-Nebot et al., 2009; Cámara et al., 2007; Laparra et al., 2003). Thus, the soluble fraction obtained after centrifuging the digest, previously adjusting its osmolarity, is added to the cell lineage Caco – 2, which has been previously grown and developed on a microporous support (see Figure 3). Another alternative would be to carry out an intestinal phase of the dialysis process with a cylindrical insert and a piece of dialysis membrane fastened to one end with an elastic band placed inside each well, where human Caco – 2 cells have been growing, in such a way that the membrane is in contact with the digest (Argyri et al., 2011; Argyri et al., 2009).

Although the concept of bioavailability has been traditionally used for both *in vitro* and *in vivo* studies, recently most of the published works in this area have exclusively applied the term bioavailability to results obtained from *in vivo* studies and bioaccessibility for results from *in vitro* studies (Cámara – Martos et al., 2011). The determination of the bioavailable selenium fraction present in a food therefore implies making *in vivo* studies.

Within these types of study, first, there are those performed with animal models, mainly rats. The use of radioactive isotopes for the determination of mineral bioavailability in animal models has been widely extended (Olivares et al., 2007a, b; García-Casal et al., 2003). In the case of selenium, Se^{75} a radionuclide with a $t_{1/2} = 119.78$ days, has been used to study the influence of the phytic acid present in wheat flour on the bioavailability of selenium in rats (Saha et al., 1994). The same isotope was also used for the determination of bioavailability with rats given test meals of broccoli or pork intrinsically labelled (Finley et al. 2004). However, at present, due to both environment and health problems triggered by handling radioactive isotopes, this type of marker is increasingly less used. Obviously, its application in humans, and especially in specific groups like pregnant women or children has been totally discarded.

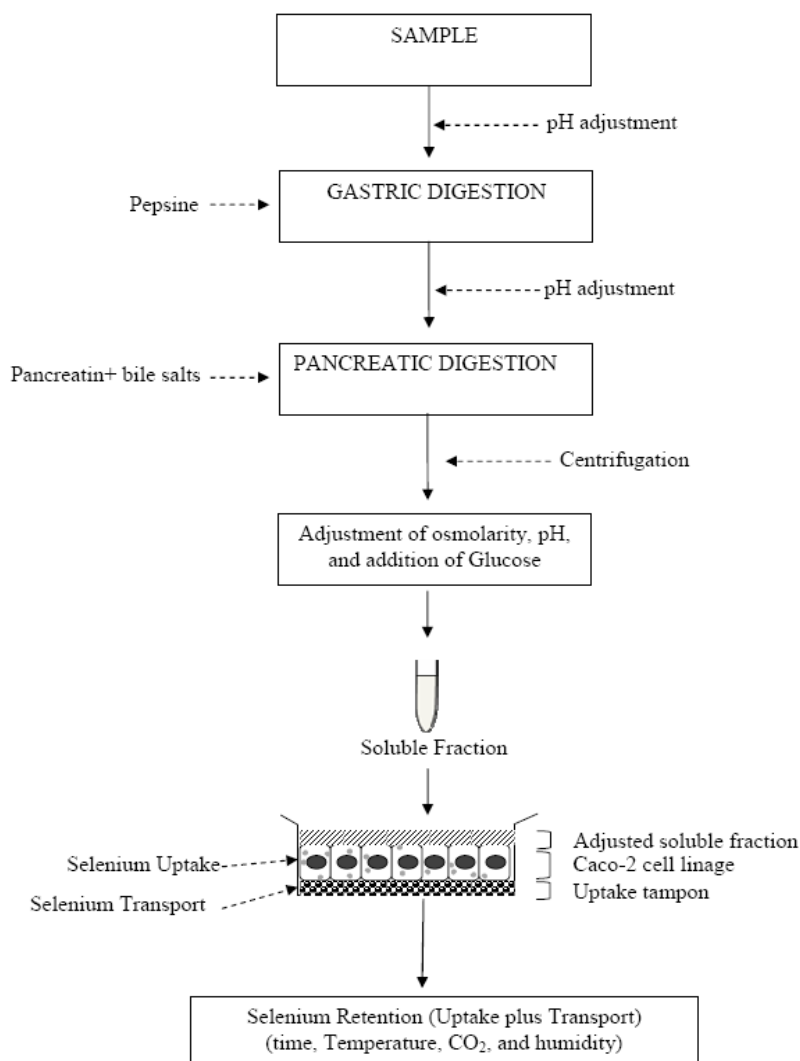


Figure 3. In vitro digestión + Caco-2 cell line assay scheme.

Functional bioassays, such as activity restoration of glutathione peroxidase, are among the most commonly used methods to assess the bioavailability of selenium from food in humans and animals (Reeves et al., 2005). Glutathione peroxidase activity can be determined in whole blood and liver by the method of Paglia and Valentine (1967) using hydrogen peroxide as the substrate. Activity in whole blood is expressed as units / mg hemoglobin and for liver as units / mg protein. One unit is defined as the amount of enzyme required to oxidize 1.0 μmol NADPH/min. Another marker that can also be employed to determine selenium bioavailability is thioredoxinreductase activity in liver by the method of Hill et al. (1997). In this case, a unit of activity is defined as 1.0 μmol thionitrobenzoate formed / min mg protein.

The glutathione peroxidase activity assay is widely known due to it being relatively easy to carry out and automate. It is based on the positive correlation which has been found between levels of body selenium and glutathione peroxidase activity within population groups ingesting different amounts of selenium. However, the main drawback of this test is that positive correlation is only maintained at a certain intake level. For high intakes of this element the correlation becomes less significant and reaches a saturation level of this enzyme (Néve, 2000). A good correlation between blood selenium and glutathione peroxidase activity of up to approximately 79 µg/L (1.0 µmol/L) has been seen, so that as some authors have indicated, the activity of this enzyme can only be used as an indicator of human selenium status only with a low level of exposure to dietary selenium (Diplock, 1993).

Other types of tissues besides blood which can also be used as potential biomarkers of selenium status are finger – and toe - nails, especially in epidemiological studies (Slotnick et Nriagy, 2006; Hartman et al., 2002; Garland et al., 1995). The main advantage of these types of technique is that they are not invasive and that both the transport and handling of the samples collected are easy. Finally, other selenium compounds like selenoprotein P have been employed in humans to test the bioavailability and nutritional requirements of this element showing that their optimization needs a larger intake of selenium than does glutathione peroxidase activity (Xia et al., 2010). However, these selenium compounds are hardly used in routine clinical practice and future research on them should be conducted in the future.

Also, as occurs for other trace elements, the bioavailability and/or the bioaccessibility of selenium is conditioned by a series of both physiological and dietary factors. With regard to the physiological ones, selenium bioavailability depends on aspects like selenium status in the organism, age, sex and lifestyles. Thus, it has been noted how, for example, selenium status of smokers is lower than that of nonsmokers; it is not exactly known if this is due to a lower selenium intake or to the fact that smoking may increase the requirement of antioxidants like selenium (Thomson, 2004).

With respect to the dietary factors, one of the most important of these is the chemical form in which the selenium is present in the foodstuff since the bioavailability of the organic compounds of selenium is greater than that of the inorganic ones (Fairweather – Tait et al., 2010; Dumont et al., 2006). The forms of selenium present in foods include selenomethionine (plant and animal), accounting for half of the dietary selenium with a bioavailability of over 90% (Thomson and Robinson, 1986); selenocysteine, also with high bioavailability; and inorganic forms such as selenate and selenite (supplements) with a bioavailability exceeding 50% (Thomson and Robinson, 1986). Along with the supplements, these inorganic selenium forms can also be present in foods of vegetable origin (Cubadda et al., 2010; Pedrero et al., 2006; Stefanka et al., 2001). Some authors postulate the existence of two major compartments of selenium in

the human body: i) a selenocystein compartment, regulated by selenium availability at low levels of intake, comprising a relatively small number of proteins containing selenium incorporated as selenocysteine by a highly specific co – translational process (Low et al., 1995; Sunde et al., 1987). ii) a non – specific selenomethionine compartment, relatively large and not specifically regulated, comprising general proteins in which selenomethionine is incorporated as a mimic of its sulfur – analog methionine (Yan et al., 2010). Thus, the chemical form of selenium partly determines its metabolism and its ultimate biological action (Reeves et al., 2005).

Together with the chemical form of selenium, the presence of other components present in food may also affect its bioavailability. For instance, vitamin E increases selenium bioavailability and it has been observed that diets low in vitamin E can increase selenium requirements (Thomson, 2004). These two micronutrients act synergically, protecting the cell membranes from lipid peroxidation so that, under normal physiological conditions, a low glutathione peroxidase activity can be compensated for by other antioxidant components such as vitamins E and C (Thomson, 2004).

In another direction, the effect of the type of dietary fat (butter, olive oil, rapeseed oil, corn oil or sunflower oil) on selenium bioavailability has also been studied in chicks (Mutanen and Mykkänen, 1984). It was seen that for 4% of fat in the diet, the glutathione peroxidase activity rose as the percentage of polyunsaturated fat in the diet increased (rapeseed oil, corn oil and sunflower oil), which demonstrates that selenium is more bioavailable in diets containing polyunsaturated fatty acids. However, the same study also showed that when the percentage of fat was increased to 20%, that effect was not observed, indicating that at this high level of fat intake the plasma glutathione peroxidase activity may be maximally stimulated (Mutanen and Mykkänen, 1984).

Finally, selenium has also been seen to have a strong negative interaction with heavy metals like mercury and cadmium (Marval – León et al. 2014; Burger et al., 2013; Calatayud et al., 2012; Pappas et al., 2011; Kaneko & Ralston, 2007). Apparently, selenium forms insoluble compounds with those heavy metals thus diminishing their absorption in the intestinal lumen so that a protective role against the toxicity of those elements can be attributed to it. However, its bioavailability also declines. Taking into account that the chief objective of this chapter is to review the main factors affecting selenium bioavailability, next we have grouped the different studies made in this field according to the principal groups of foods that are considered to be good dietary sources of this element.

1.5.1. Meat products

Meat is the main dietary source of selenium for many population groups in northern Europe and United States (Koutnik and Ingr, 1998). Liver, and especially kidneys (with contents of up to 1.5 µg/g) are also excellent sources. The

bioavailability studies carried out with animal models show how selenium bioavailability from minced beef is higher than that of selenite or selenate (Shi and Spallholz, 1994a). Thus, the recovery in glutathione peroxidase activity in liver is greater in rats fed with selenomethionine and beef diets compared to animals fed with selenite (Shi and Spallholz, 1994b).

The studies made with pork meat are less conclusive. Finley et al. (2004), in rats with a moderate intake of selenium ($0.1 \mu\text{g Se/g diet}$), showed a higher bioavailability of selenium in pork meat as opposed to that in a vegetable source such as broccoli. However, there were no differences between either foodstuff when the amount of selenium in the diet was higher ($1.5 \mu\text{g Se/g diet}$). Parallely, a study made in humans with pork meat (Bügel et al., 2004) demonstrated a high selenium absorption and retention (94%). However, this increase was not noted in selenium concentration in plasma and glutathione peroxidase activity in red cells, which revealed a low bioavailability of selenium from pork meat. According to this study the high retention of selenium could be due to a low selenium status in the individuals participating, which was not manifested in the plasma concentrations or in the glutathione peroxidase activity. To justify the low selenium bioavailability, the authors also maintain that selenium in pork meat does not come in the form of selenomethionine. As was previously remarked, selenomethionine enters as a non – exchangeable pool and is handled as methionine, thereby increasing body stores and plasma concentrations in direct proportion to its intake.

1.5.2. Cereals and Other Vegetable Products

The selenium content in cereals and derived products ranged between $0.032 - 0.039 \mu\text{g/g}$ for wheat, $0.012 - 0.024 \mu\text{g/g}$ for rice and $0.032 - 0.078 \mu\text{g/g}$ for bread, according to some research works (Díaz – Alarcón et al., 1996). The bioavailability of wheat products has been seen in humans, after a 5-week period of low selenium intake, to have very similar values to those of meat products (the type of meat is not specified), in terms of selenium levels in plasma and glutathione peroxidase activity (Van der Torre et al., 1991). The only difference between both sources was a higher concentration of selenium in erythrocytes in meat-eating people.

On the other hand, there are relatively few bioaccessibility and bioavailability studies with fruit and vegetables probably due to their low selenium content, which makes it difficult to determine this fraction to carry out speciation analyses. Finley et al. (1998), in rats, studied the capacity to restore selenium levels in plasma and glutathione peroxidase activity starting from selenium-enriched broccoli in comparison with selenomethionine, selenite and selenate. The three

separate selenium species had a better capacity than broccoli to restore these parameters. This indicates that the selenium form present in broccoli must be different from selenite, selenate or selenomethionine, and that this species participates less efficiently in the synthesis of selenoproteins. This form is probably methyl – selenocysteine or γ - glutamyl – methyl – selenocysteine (Thiry et al., 2012). The bioaccessibility of selenium-enriched broccoli has also been studied as from a Caco-2 cell model preceded by a simulated gastrointestinal digestion (Zeng et al., 2008). Caco-2 cells were grown in medium depleted in selenium and then supplemented with increasing concentrations of either digested broccoli, or methyl – selenocysteine directly. It was observed how methyl – selenocysteine improved the glutathione peroxidase activity more than broccoli did. However, these differences were more significant for low concentrations of selenium, which also suggests the influence of other components present in the food matrix.

It is therefore of great interest to deepen the study and identification of the selenium species which form during the digestion process in order to relate them to their bioaccessibility. Brazil nuts are another food of vegetable origin with a high content in selenium ($5.1\mu\text{g/g}$ without shell). A recent study shows how the main compounds present in the matrix after proteolytic digestion are selenocysteine and selenomethionine, the latter being the major compound (Dumont et al., 2006 b); however, no bioaccessibility percentage was offered in that study. Kápolna et al. (2007) also used in vitro – gastrointestinal digestion to determine selenium bioaccessibility in green onion and chives fortified with selenite, selenate and selenomethionine. Se^{+4} , Se^{+6} and selenomethionine species were quantified in the bioaccessible fraction from selenite – fortified green onion and chives (with 30% and 12% of bioaccessible selenium, respectively). In relation to the green onion and chives fortified with selenomethionine, the species quantified in the gastrointestinal digests were Se^{+4} , selenomethionine, methyl – selenocysteine and selenomethionine – oxide. The most relevant point in this research is that between 3 – 10% of unknown selenium compounds were quantified in the gastrointestinal digest.

1.5.3. Fish and Seafood

The selenium bioaccessibility studies carried out on fish and seafood species are hardly conclusive. While some studies indicate that people having a high fish and seafood intake reveal an 81% increase in selenium levels in plasma (Hagmar et al., 1998), others show that consumption of this kind of products only produces a slight increase in plasma levels and no increase in glutathione peroxidase activity or selenoprotein P is observed (Huang et al., 1995). Differences observed can be

caused by the different bioavailability of selenium species present in fish, among other related factors. Selenium bioavailability from shrimps has been studied in mice (Yu et al., 2014) with apparent absorption ratios of 88%, 86% and 86% for diets supplemented with 2, 8 and 16 $\mu\text{g/Kg}$ body weight from shrimps. Selenium content in liver, kidney, blood and spleen and glutathione peroxidase activities in liver and blood increased significantly from selenium supplemented groups compared to the control group.

The selenium contents and bioaccessibility using a simulated gastrointestinal digestion in twenty samples of fresh fish and seafood widely consumed in Spain have been determined by Marval – León et al. (2014). Selenium contents were between 0.638 $\mu\text{g/g}$ in mackerel and 0.052 $\mu\text{g/g}$ in iridescent shark (also called panga). The percentages of bioaccessible selenium (soluble) were relatively high (43 – 84%) for the species belonging to the fatty fish and seafood group (mackerel, tuna, shrimp and prawn) being those which presented a higher content of soluble selenium. These results are in accordance with those reported by Calatayud et al. (2012), where selenium bioaccessibility, expressed as solubility, ranged between 105–39% for a wide variety of seafood products. Similarly, Cabañero et al. (2004) using the same *in vitro* procedure but with a more reduced number of species, found some soluble selenium percentages of 76% for swordfish, 83% for sardine and 50% for tuna. In this last work, a speciation analysis of selenium in the gastrointestinal extracts was made. It was observed that tuna, swordfish and sardine had similar percentages of bioaccessible selenomethionine (19, 14 and 16% respectively) relative to the total selenium content

In the study of Marval – León et al. (2014) previously mentioned, selenium bioaccessibility was also determined using the dialysis method, which permits us to distinguish between soluble compounds of a high and low molecular weight. For this case, the dialyzable selenium percentages fell drastically in the twenty species and did not exceed 15%, which indicates that fish is not a good source of bioaccessible selenium according to its dialyzability. Similar results have been obtained by Moreda – Piñero et al. (2013 a) where the dialyzability of selenium in white fish, cold water fish and mollusk ranged from 4 to 13%. These authors concluded that selenium is highly soluble but is not easily dialyzed from fish and mollusk. Many of the soluble selenium compounds present in the fish digests are possibly not capable of crossing the pore size of the intestinal membrane. It would therefore be necessary to go more deeply into the identification and speciation of these compounds.

With regard to the influence of other dietary components present in fish, a significant correlation between dialyzable selenium and fat content has been observed by Marval – León et al. (2014), which implies a lower dialyzability of selenium as fat content increases in fish. This effect is not observed in a similar

study made by Moreda – Piñero (2013 b). These authors argue that selenium species are poorly lipophilic molecules, as a result of which they will not be retained by the fatty micelles even after the emulsification of the fat by the biliar salts. The same study (Moreda – Piñero et al., 2013 b) has also shown a negative correlation between dialyzable selenium and protein content. Proteins are hydrolyzed to amino acids during the gastrointestinal digestion phase. Many of these amino acids are soluble and maintain positive and negative charges at the physiological pH used during the digestion. Their increased ionic strength diminishes the solubility of the selenium species in the aqueous phase as a result of the “salting-out” effect and, consequently, this also decreases bioaccessibility (Yu et al., 2010). Finally, a positive correlation between fibre and dialyzable selenium was observed in seaweeds which it can be justified as most dietary fibre is soluble fibre (Moreda – Piñero et al., 2013 b). Vitali et al (2008) have found some high mineral bioavailability ratios in vegetables with a high content in this soluble fibre.

Finally, selenium bioavailability also decreases in presence of heavy metals such as mercury, cadmium and thallium because of the formation of selenides, which are highly insoluble, which contributes to keeping these metals biologically unavailable (Eisler, 1999). This fact is especially relevant in fish and seafood, the main dietary sources of these heavy metals. Marval – León et al. (2014) have found a negative correlation between soluble selenium and cadmium content in fish, which indicates that the higher the cadmium content in the fish, the lower the selenium bioaccessibility. However, this protective effect of selenium against heavy metal toxicity will also depend on the species of selenium and the selenium – heavy metal ratios. Several studies with model animals have shown that the uptake of mercury and its distribution within different organs depend on the form of selenium administered (Bjerregaard and Christensen, 2012). Similarly, Wang et al. (2004) have studied the influence of different selenium species (Se^{+4} , Se^{+6} and selenomethionine) on the uptake and assimilation of mercury and methyl – mercury by diatoms and green mussels. It was observed that Se^{+4} and Se^{+6} did not significantly affect the uptake of mercury and methyl – mercury by diatoms and green mussels. However, selenomethionine significantly enhanced the uptake of mercury and inhibited the uptake of methyl – mercury by diatoms and mussels. Although it seems clear that selenium can minimize the toxic effects of heavy metals, the specific mechanisms of interaction heavy metal – selenium as well as which selenium species are more effective remains unclear. Therefore, future researches are needed to attain a better understanding of heavy metals absorption and the protective role of selenium.

1.6. References

- Argyri, K., Theophanidi, E., Kapna, A., Staikidou, C., Pounis, G., Komaitis, M., Georgiou, C. & Kapsalefalou, M. (2011). Iron or zinc dializability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. *Food Chemistry*, 127, 716-721.
- Argyri, K., Birba, A., Miller, D. D., Komaitis, M. & Kapsalefalou, M. (2009). Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using in vitro digestion: new developments. *Food Chemistry*, 113, 602-607.
- Arvy, M. P. (1993). Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Experimental Botany*, 44, 1083 – 1087.
- Bangarwa, S. K., Norsworthy, J. K., Mattice, J. D. & Gbur, E. E. (2011). Glucosinolate and isothiocyanate production from Brassicaceae cover crops in a plasticulture production system. *Weed Science*, 59, 247 – 254.
- Barickman, T. C., Kopsell, D. A. & Sams, C. E. (2013). Selenium influences glucosinolate and isothiocyanates and increases sulfur uptake in *Arabidopsis thaliana* and rapid – cycling *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 202 – 209.
- Belzile, N., Chen, Y. W. & Xu, R. (2000). Early diagenetic behaviour of selenium in freshwater sediments. *Applied Geochemistry*, 15, 1439 – 1454.
- Bierla, K., Dernovics, M., Vacchina, V., Szpunar, J., Bertin, G. & Lobinski, R. (2008). Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP-MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 1789–1798.
- Bügel, S., Sandström, B. & Skibsted, H. (2004). Pork meat: a good source of selenium? *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 17(4), 307 – 311.
- Burger, J., Jeitner, C., Donio, M., Pittfield, T. & Gochfeld, M. (2013). Mercury and selenium levels, and selenium: mercury molar ratios of brain, muscle and other tissues in bluefish (*Pomatomus saltatrix*) from New Jersey, USA. *Science of the Total Environment*, 443, 278–286.
- Burk, R. F., Levander, O. A., Shils, M. E., Olson, J. A. & Shike, M. (1999) Selenium. In: *Modern nutrition in health and disease*. Williams and Wilkins, Baltimore (USA), 265 – 276.
- Cabañero, A. I., Madrid, Y. & Cámara, C. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro method. *Analitica Chimica Acta*, 526, 51–61.
- Calatayud, M., Devesa, V., Virseda, J. R., Barberá, R. & Montoro, R. (2012). Mercury and selenium in fish and shellfish: occurrence, bioaccessibility and uptake by Caco – 2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2696 – 2702.
- Cámara – Martos, F., Pérez – Rodríguez, F., Amaro – López, M. A. & Moreno Rojas, R. (2011). Zinc as essential micronutrient: physiological role and factors affecting its bioavailability. In: *Micronutrients: source, properties and health effects*. A. Betancourt and HF. Gaitán (eds) Nova Science Publishers (USA).
- Cámara, F., Barberá, R., Amaro, M. A. & Farré, R. (2007). Calcium, iron, zinc and copper transport and uptake by Caco-2 cells in school meals: influence of protein and mineral interactions. *Food Chemistry*, 100, 1085-1092.
- Cámara, F., Amaro, M. A., Barberá, R. & Clemente, G. (2005). Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chemistry*, 92, 481-489.

- Charron, C. S., Kopsell, D. A., Randle, W. M. & Sams, C. E. (2001). Sodium selenate fertilisation increases Se accumulation and decreases glucosinolate concentration in rapid – cycling *Brassica oleracea*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 962 – 966.
- Choi, M. K., Kang, M. H. & Kim, M. H. (2009). The analysis of copper, selenium and molybdenum contents in frequently consumed foods and an estimation of their daily intake in Korean adults. *Biological Trace Element Research*, 128, 104–117.
- Cubadda, F., Aureli, F., Ciardullo, S., D'Amato, M., Raggi, A., Acharya, R., et al. (2010). Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2295–2301.
- De Temmerman, L., Waegeneers, N., Thiry, C., Du Laing, G., Tack, F. & Ruttens, A. (2014). Selenium content of Belgian cultivated soils and its uptake by field crops and vegetables. *Science of the Total Environment*, 468 – 469, 77 – 82.
- Díaz – Alarcón, J. P., Navarro – Alarcón, M., López – García de la Serrana, H. & López – Martínez, C. (1996). Determination of selenium in cereals, legumes and dry fruits from southeastern Spain for calculation of daily dietary intake. *Journal of the Science of the Total Environment*, 184, 183 – 189.
- Diplock, A. T. (1993). Indexes of selenium status in human populations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 256S – 258S.
- Dreosti, I. (1986). Selenium. *Journal of Food Nutrition*, 43, 60 – 78.
- Dumont, E., Vanhaecke, F. & Cornelis, R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1304 – 1323.
- Dumont, E., De Pauw, L., Vanhaecke, F. & Cornelis, R. (2006 b). Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? *Food Chemistry*, 95, 684 – 692.
- Eisler, R. (1999). Mercury hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Contaminant Hazard Reviews, Report 10, USGS/BSR-1999-0002.
- Ellis, D. R. & Salt, D. E. (2003). Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 273 – 279.
- Fairweather-Tait, S. J., Collings, R. & Hurst, R. (2010). Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1484S–1491.
- Fairweather – Tait, S. J. (1997). Bioavailability of selenium. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51, S20 – S23.
- Finley, J. W., Grusak, M. A., Keck, A. S. & Gregoire, B. R. (2004). Bioavailability of selenium from meat and broccoli as determined by retention and distribution of ⁷⁵Se. *Biological Trace Element Research*, 99, 191 – 209.
- Finley, J. W. (1998). The absorption and tissue distribution of selenium from high selenium broccoli are different from selenium from sodium selenite, sodium selenate, and selenomethionine as determined in selenium-deficient rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3702–3707.
- Fordyce, F. M., Brereton, N., Hughes, J., Luo, W. & Lewis, J. (2010). An initial study to assess the use of geological parent materials to predict the Se concentration in overlying soils and in five staple foodstuffs produce on them in Scotland. *Science of the Total Environment*, 408, 5295 - 5305.
- García-Casal, M. N., Layrisse, M., Peña-Rosas, J. P., Ramírez, J., Leets, I. & Matus, P. (2003). Iron absorption from elemental iron-fortified corn flakes in humans. Role of vitamins A and C. *Nutrition Research*, 23, 451-463.
- García-Nebot, M. J., Alegria, A., Barberá, R., Clemente, G. & Romero, F. (2009). Does the addition of caseinophosphopeptides or milk improve zinc in vitro bioavailability in fruit beverages? *Food Research International*, 42, 1475-1482.

- Garland, M., Morris, S., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Spate, V. L., Baskett, B. K., et al. (1995). Prospective study of toenail selenium levels and cancer among women. *Journal of National Cancer Institute*, 87, 487 – 505.
- Gerla, P. J., Sharif, M. U. & Korom, S. F. (2011). Geochemical process controlling the spatial distribution of selenium in soil and water, west central South Dakota. *Environment Earth Science*, 62, 1551 – 1560.
- Gimsing, A. & Kikegaard, J. A. (2009). Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemical Review*, 8, 299 – 310.
- Hagmar, L., Persson-Mochoss, M., Akkesson, B. & Schültz, A. (1998). Plasma levels of selenium, selenoprotein P and glutathione peroxidase and their correlation to fish intake and serum levels of thyrotropin and thyroid hormones: a study on Latvian fish consumers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52, 796–800.
- Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of the Trace Elements in Medicine and Biology*, 18, 309–318.
- Hartman, T. J., Taylor, P. R. & Alfthan, G. (2002). Toenail selenium concentration and lung cancer in male smokers (Finland). *Cancer Causes Control*, 13, 923 – 928.
- Hawkesford, M. J. & Zhao, F. J. (2007). Strategies for increasing the selenium content of wheat. *Journal of Cereal Science*, 46, 282 – 292.
- Hill, K. E., McCollum, G. W. & Burk, R. F. (1997). Determination of thioredoxin reductase activity in rat liver supernatant. *Analytical Biochemistry*, 253, 123 – 125.
- Huang, W., Akkesson, B., Svensson, B. G., Schültz, A., Burk, R. F. & Skeverfving, S. (1995). Selenoprotein P and glutathione peroxidase in plasma as indices of selenium status in relation to the intake of fish. *British Journal of Nutrition*, 73, 455–461.
- Jacobs, L. W. (1989). Selenium in agriculture and the environment. SSSA Special Publication 23. Soil Science Society American, Madison.
- Kaneko, J. J. & Ralston, N. V. (2007). Selenium and mercury in pelagic fish in the Central North Pacific near Hawaii. *Biological Trace Element Research*, 119, 242–254.
- Kápolna, E. & Fodor, P. (2007). Bioavailability of selenium from selenium – enriched green onions (*Allium fistulosum*) and chives (*Allium schoenoprasum*) after “in vitro” gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 58(4), 282 – 296.
- Koutnik, V. & Ingr, I. (1998). Meat as a source of selenium in human nutrition. *Fleischwirtschaft*, 78, 534 – 536.
- Laparra, J. M., Vélez, D., Montoro, R., Barberá, R. & Farré, R. (2003). Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 6080 – 6085.
- Lenz, M. & Lens, P. N. L. (2009). The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of the Total Environment*, 407, 3620–3633.
- Lenz, M., Janzen, N. & Lens, P. N. L. (2008). Selenium oxyanion inhibition of hydrogenotrophic and acetoclastic methanogenesis. *Chemosphere*, 73, 383–388.
- Low, S. C., Harney, J. W. & Berry, M. J. (1995). Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 21659 – 21664.
- Ly, S. M., Heller, L. I., Rutzke, M., Welch, R. M., Kochian, L. V. & Li, L. (2005). Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli. *Plant Physiology*, 138, 409–420.
- Madeja, Z., Sroka, J., Nyström, C., Björkhem – Bergman, L., Nordman, T., Damdimopoulos, A., Nalvarte, I., Eriksson, L. C., Spyrou, G., Olsson, J. M. & Björnstedt, M. (2005). The role of thioredoxin reductase activity in selenium – induced cytotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, 69(12), 1765 – 1772.

- Marval – León, J., Cámara – Martos, F., Amaro – López, M. A. & Moreno – Rojas, R. (2014). Bioaccessibility and content of Se in fish and shellfish widely consumed in Mediterranean countries: influence of proteins, fat and heavy metals. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(6), 678–685.
- Mapelli, V., Hillestrom, P. R., Kápolna, E., Larsen, E. H. & Olsson, L. (2011). Metabolic and bioprocess engineering for production of selenized yeast with increased content of seleno – methylselenocysteine. *Metabolic Engineering*, 13, 282 – 293.
- Merian, E., Anke, M., Ihnat, M. & Stoeppler, M. (2004). Elements and their compounds in the environment. Wiley, Weinheim (Germany), p 263.
- Moreda – Piñero, J., Moreda – Piñero, A., Romarís – Hortas, V., Domínguez – González, R., Alonso – Rodríguez, E., López – Mahía, P., Muniategui – Lorenzo, S., Prada – Rodríguez, D. & Bermejo – Barrera, P. (2013 a). In vitro bioavailability of total selenium and selenium species from seafood. *Food Chemistry*, 139, 872 – 877.
- Moreda – Piñero, J., Moreda – Piñero, A., Romarís – Hortas, V., Domínguez – González, R., Alonso – Rodríguez, E., López – Mahía, P., Muniategui – Lorenzo, S., Prada – Rodríguez, D. & Bermejo – Barrera, P. (2013 b). ICP – MS for the determination of selenium bioavailability from seafood and effect of major food constituents. *Microchemical Journal*, 108, 174 – 179.
- Mutanen, M. L. & Mykkänen, H. M. (1984). Effect of dietary fat on plasma glutathione peroxidase levels and intestinal absorption of ⁷⁵Se – labeled sodium selenite in chicks. *Journal of Nutrition*, 114, 829 – 834.
- Neuhierl, B., Thanbichler, M., Lottspeich, F. & Bock, A. (1999). A family of S – methyl – methionine – dependent thiol/selenolmethyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 5407 – 5414.
- Nève, J. (2000). New approaches to assess selenium status and requirements. *Nutrition Reviews*, 58, 363 – 369.
- Ng, B. H. & Anderson, J. W. (1979). Light – dependent incorporation of selenite and sulphite into selenocysteine by isolated pea chloroplasts. *Phytochemistry*, 17, 2069 - 2074
- Olivares, M., Pizarro, F. & Ruz, M. (2007a). New insights about iron bioavailability inhibition by zinc. *Nutrition*, 23, 292-295.
- Olivares, M., Pizarro, F., Gaitán, D. & Ruz, M. (2007b). Acute inhibition of iron absorption by zinc. *Nutrition Research*, 27, 279-282.
- Paglia, D. E. & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 70, 158 – 169.
- Pappa, E. C., Pappas, A. C. & Surai, P. F. (2006). Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. *Science of the Total Environment*, 372, 100–108.
- Pappas, A. C., Zoidis, E., Georgiou, C. A., Demiris, N., Surai, P. F. & Fegeros, K. (2011). Influence of organic selenium supplementation on the accumulation of toxic and essential trace elements involved in the antioxidant system of chicken. *Food Additives and Contaminants Part A*, 28, 446–454.
- Pedrero, Z., Madrid, Y. & Camara, C. (2006). Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanussativus*): A potential dietary source of selenium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2412–2417.
- Presser, T. S. & Swain, W. C. (1990). Geochemical evidence for Se mobilization by the weathering of pyritic shale, San Joaquin Valley, California, USA. *Applied Geochemistry*, 5, 703 – 717.
- Pyrzynska, K. (1998). Speciation of selenium compounds. *Analytical Sciences*, 14, 479 – 483.

- Quin, H., Zhu, J. & Su, H. (2012). Selenium fractions in organic matter from Se – rich soils and weathered stone coal in selenosis areas of China. *Chemosphere*, 86, 626 – 633.
- Reeves, P. G., Leary, P. D., Gregoire, B. R., Finley, J. W., Lindlauf, J. E. & Johnson, L. K. (2005). Selenium bioavailability from buckwheat bran in rats fed a modified AIN – 93G torula yeast – based diet. *Journal of Nutrition*, 22, 2627 – 2633.
- Saha, P. R., Weaver, C. M. & Mason, A. C. (1994). Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2531 – 2535.
- Sahuquillo, A., Barberá, R. & Farré, R. (2003). Bioaccessibility of calcium, iron and zinc from three legume samples. *Nahrung*, 47(6), 438–441.
- Satovic, V. & Beker, D. (2004). Selenium content in sea bass of the Adriatic Sea. *European Food Research and Technology*, 218, 111–113.
- Schrauzer, G. N. (2000). Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Journal of Nutrition*, 130, 1653 – 1656.
- Sharma, N., Prakash, R., Srivastava, A., Sadana, U. S., Acharya, R., Prakash, N. T., et al (2009). Profile of selenium in soil and crops in seleniferous area of Punjab, India by neutron activation – analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 281, 59 – 62.
- Shi, B. & Spallholz, J. (1994 a). Bioavailability of selenium from raw and cooked ground beef assessed in selenium-deficient Fischer rats. *Journal of the American College of Nutrition*, 13, 95–101.
- Shi, B. & Spallholz, J. (1994 b). Selenium from beef is highly bioavailable as assessed by liver glutathione peroxidase activity and tissue selenium. *British Journal of Nutrition*, 72, 873–881.
- Slotnick, M. J. & Nriagu, J. O. (2006). Validity of human nails as a biomarker of arsenic and selenium exposure: a review. *Environmental Research*, 102, 125 - 139
- Spadoni, M., Voltaggio, M., Carcea, M., Coni, E., Raggi, A. & Cubadda, F. (2007). Bioaccessible selenium in Italian agricultural soils: comparison of biogeochemical and pedoclimatic variables. *Science of the Total Environment*, 376, 160 – 177.
- Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R. M., et al. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 23, 39–100.
- Stefanka, Z., Ipoly, I., Dernovics, M. & Fodor, P. (2001). Comparison of sample preparation methods based on proteolytic processes for Se-speciation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) samples. *Talanta*, 55, 437–447.
- Stewart, R. D. H., Griffiths, N. M., Thomson, C. D. & Robinson, M. F. (1987). Quantitative selenium metabolism in normal New Zealand women. *British Journal of Nutrition*, 40, 45 – 54.
- Sunde, R. A. & Evenson, J. K. (1987). Serine incorporation into the selenocysteine moiety of glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 933 – 937.
- Suzuki, Y., Hashiura, Y., Matsumura, K., Matsukawa, T., Shinohara, A. & Furuta, N. (2009). Dynamic pathways of selenium metabolism and excretion in mice under different selenium nutritional stresses. *Metallomics*, 2, 126–132.
- Suzuki KT, Kurasaki K, Ogawa S & Suzuki, N. (2006a). Metabolic transformation of methylseleninic acid through key selenium intermediate selenide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215, 189–197.
- Suzuki, K. T., Doi, C. & Suzuki, N. (2006b). Metabolic pathway of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-selenomethionine and ⁸²Se-selenite. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217, 185–195.

- Tagmount, A., Berken, A. & Terry, N. (2002). Methylation of selenomethionine to selenium – methyl – L – selenomethionine, the precursor of volatile selenium. *Plant Physiology*, 130, 847 – 856.
- Terry, N., Zayed, M., de Souza, M. P. & Tarun, A. S. (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 401–32.
- Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y. J. & Pussemier (2012). Current knowledge in species – related bioavailability of selenium in food. *Food Chemistry*, 130, 767 – 784.
- Thomson, C. D. (2004). Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: A review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, 391–402.
- Thomson, C. D. & Robinson, M. F. (1986). Urinary and fecal excretions and absorption of a large supplement of selenium: superiority of selenate over selenite. *American Journal of Clinical Nutrition*, 44, 659–665.
- Toler, H. D., Charron, C. S., Sams, C. E. & Randle, W. R. (2007). Selenium increases sulfur uptake and regulates glucosinolate metabolism in rapid-cycling Brassica oleracea. *Journal of American Science of Horticulture Science*, 132(1), 14–19.
- Tolu, J., Le Hécho, I., Bueno, M., Thiry, Y. & Potin – Gautier, M. (2011). Selenium speciation analysis at trace level in soils. *Analytica Chimica Acta*, 684, 126 – 133.
- Tolu, J., Thiry, Y., Bueno, M., Jolivet, C., Potin – Gautier, M. & Le Hécho, I. (2014). Distribution and speciation of ambient selenium in contrasted soils, from mineral to organic rich. *Science of the Total Environment*, 479 – 480, 93 – 101.
- Traka, M. & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, 8, 269–282.
- Van der Torre, H. W., Van Dokkum, W., Schaafsma, G., Wedel, M. & Ockhuizen, T. (1991). Effect of various levels of selenium in wheat and meat on blood Se status indices and on Se balance in Dutch men. *British Journal of Nutrition*, 65, 69 – 80.
- Vitali, D., Dragojevic, I. V. & Sebecic, B. (2008). Bioaccessibility of Ca, Mg, Mn and Cu from whole grain tea – biscuits: impact of proteins, phytic acid and polyphenols. *Food Chemistry*, 110, 62 – 68.
- Wang S, Liang D, Wang D, Wei W, Fu D & Lin Z (2012). Selenium fractionation and speciation in agriculture soils and accumulation in corn (*Zea mays* L.) under field conditions in Shaanxi Province, China. *Science of the Total Environment*, 427 – 428, 159 – 164.
- Whanger, P. D. (2002). Selenocompound in plants and animals and their biological significance. *Journal of American College of Nutrition*
- Xia, Y., Hill, K. E., Li, P., Xu, J., Zhou, D., Motley, A. K., Wang, L., Byrne, D. W. & Burk, R. F. (2010). Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo – controlled, double – blind study of selenomethionine supplementation in selenium – deficient Chinese subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 525 – 531.
- Yan, L., Reeves, P. G. & Johnson, L. K. (2010). Assessment of selenium bioavailability from naturally produced high – selenium soy foods in selenium – deficient rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 223 – 229.
- Yu, T., Yang, Z., Lv, Y., Hou, Q., Xia, X., Feng, H., et al. (2014) The origin and geochemical cycle of soil selenium in a Se – rich area of China. *Journal of Geochemical Exploration*, 139, 97 – 108.
- Yu, Y. X., Li, J. L., Zhang, X. Y., Yu, Z. Q., Van de Miele, T., Han, S. Y., Sheng, G. Y. & Fu, J. M. (2010). Assessment of the bioaccessibility of polybrominated diphenyl ethers in foods and the correlations of the bioaccessibility with nutrient contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 301 – 308.

- Zayed, A. M.&Terry, N. (1994). Selenium volatilization in roots and shoots: effects of shoot removal and sulfate level. *Journal of Plant Physiology*, 143, 8 – 14.
- Zeng, H., Botnen, J. H.&Johnson, L. K. (2008).A selenium-deficient Caco-2 cell model for assessing differential incorporation of chemical or food selenium into glutathione peroxidase.*Biological Trace Element Research*, 123, 98–108.
- Zhu, Y. G., Pilon – Smits, E. A. H., Zhao, F. J., Williams, P. N.&Meharg, A. A. (2009). Selenium in higher plants: understanding mechanism for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 14(8), 436 – 442.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Primera.** Se ha podido optimizar un método para la determinación de selenio total y bioaccesible que combina el análisis por inyección de flujo (generación de hidruros) con la espectrometría de absorción atómica por calentamiento electrotérmico (ET-AAS) consiguiendo excelentes resultados en cuanto a exactitud y precisión de los resultados en diferentes matrices de alimentos. El diseño experimental seguido permitió establecer la concentración de borohidruro de sodio y de ácido clorhídrico como los factores que más afectan la sensibilidad de la técnica.
- Segunda.** Las especies pesqueras, sobre todo las especies de pescado azul (caballa y atún), seguidas de moluscos (chirlas, berberechos, mejillones y calamares) y crustáceos (gambas y langostinos) presentaron unos contenidos de selenio relativamente altos. De acuerdo con esto, estos alimentos pueden considerarse una excelente fuente de selenio total en la dieta y su consumo debe potenciarse.
- Tercera.** Sin embargo, aunque las especies pesqueras representan una buena fuente de selenio en la dieta, la bioaccesibilidad del mineral a partir de estas fuentes es relativamente baja; siendo dializable menos del 15% del selenio total. Esto indica que la mayoría del selenio en estas especies no puede atravesar la barrera intestinal y por lo tanto no está fisiológicamente disponible para los procesos metabólicos.
- Cuarta.** No se encontraron evidencias que correlacionen el selenio bioaccesible de las especies pesqueras con su contenido en proteínas. Sin embargo si se encuentra una correlación negativa entre el contenido de grasa y la bioaccesibilidad del selenio. Igualmente, la presencia de cadmio muestra un efecto significativo en la disminución de la bioaccesibilidad de selenio, lo que lleva a considerar al selenio como un elemento para contrarrestar la toxicidad del cadmio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdulah, R., Miyazaki, K., Nakazawa, M., Koyama, H., 2005. Chemical forms of selenium for cancer prevention. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 141-150. doi:10.1016/j.jtemb.2005.09.003
- Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A., Dauvillier, P., 2000. Análisis nutricional de los alimentos. Acribia, Zaragoza, España.
- Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M., Iqbal, Z., 2014. Role of selenium in male reproduction-A review. *Anim. Reprod. Sci.* 146, 55-62. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.01.009
- Aldosary, B.M., Sutter, M.E., Schwartz, M., Morgan, B.W., 2012. Case series of selenium toxicity from a nutritional supplement. *Clin. Toxicol.* 50, 57-64. doi:10.3109/15563650.2011.641560
- Ammerman, C.B., 1995. Methods for estimation of mineral bioavailability, en: Ammerman, C.B., Baker, D.H., Lewis, A. j (Eds.), *Bioavailability of nutrients for animals: amino acid, minerals and vitamins*. Academic Press, London, pp. 83-94. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-012056250-3/50031-7
- Arnér, E.S., Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6102-6109. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x
- Balada Nicolau, F., 2012. Fundamentos de endocrinología, en: Balada, F., Márquez, C., Nadal, R., Redolar, D., Silvestre, J. (Eds.), *Farmacología y endocrinología del comportamiento*. UOC, Barcelona, España, pp. 321-394.
- Baran, E.J., 1991. La Nueva Farmacoterapia Inorgánica XII. Complejos de Magnesio. *Acta Farm. Bonaer.* 10, 171-177.

- Barberá, R., Farre, R., 1992. Revisión: Biodisponibilidad de los elementos traza. *Rev. Española Cienc. y Tecnol. Aliment.* 32, 381-399.
- Barrentine, L.B., 1999. An introduction to design of experiments: A simplified approach. ASQ Quality Press, Milwaukee.
- Beaty, R.D., Kerber, J.D., 1993. Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry, Second Edi. ed. The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Connecticut.
- Beck, M.A., Levander, O.A., Handy, J., 2003. Selenium deficiency and viral infection. *J. Nutr.* 133, 1463S-1467S.
- Bender, D.A., 2009. The vitamins, en: Gibney, M.J., Lanhman-New, S.A., Cassidy, A., H, V.H. (Eds.), *Introduction to Human Nutrition*. John Wiley & Sons, Oxford, pp. 132-187.
- Bräuer, A.U., Savaskan, N.E., 2004. Molecular actions of selenium in the brain: neuroprotective mechanisms of an essential trace element. *Rev. Neurosci.* 15, 19-32. doi:10.1515/REVNEURO.2004.15.1.19
- Burk, R.F., Hill, K.E., Motley, A.K., Austin, L.M., Norsworthy, B.K., 2006. Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 1789-1793. doi:10.1055/s-0029-1237430.Imprinting
- Burk, R.F., Levander, O.A., 1999. Selenium, en: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. (Eds.), *Modern nutrition in health and disease*. Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 265-276.
- Butcher, D.J., 1995. Laser-excited atomic and molecular fluorescence in a graphite furnace, en: Sneddon, J. (Ed.), *Advances in Atomic Spectroscopy*, 2. Elsevier, pp. 1-62.

- Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C., 2007. Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method. *Biol. Trace Elem. Res.* 119, 195-211. doi:10.1007/s12011-007-8007-5
- Cabon, J.Y., Erler, W., 1998. Determination of selenium species in seawater by flow injection hydride generation in situ trapping followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* 123, 1565-1569. doi:10.1039/a802541j
- Cámara, F., Amaro, M.A., Barberá, R., Clemente, G., 2005. Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chem.* 92, 481-489. doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.009
- Campillo, N., Peñalver, R., Hernández-Córdoba, M., Pérez-Sirvent, C., Martínez-Sánchez, M.J., 2007. Comparison of two derivatizing agents for the simultaneous determination of selenite and organoselenium species by gas chromatography and atomic emission detection after preconcentration using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* 1165, 191-199. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.064
- Cao, J., Li, S., Shi, Z., Yue, Y., Sun, J., Chen, J., Fu, Q., Hughes, C.E., Caterson, B., 2008. Articular cartilage metabolism in patients with Kashin-Beck Disease: an endemic osteoarthropathy in China. *Osteoarthr. Cartil.* 16, 680-688. doi:10.1016/j.joca.2007.09.002
- Carrero, P.E., Tyson, J.F., 1998. Flow injection determination of selenium by successive retention of Se(IV) and tetrahydroborate(III) on an anion-exchange resin and hydride generation electrothermal atomization atomic absorption spectrometry with in-atomizer trapping. Part 1. Method development. *Spectrochim. acta, Part B At. Spectrosc.* 53, 1931-1943. doi:10.1016/S0584-8547(98)00243-2

- Casals Mercadal, G., Torra Santamaria, M., Deulofeu Piquet, R., Ballesta Gimeno, A.M., 2005. Importancia del selenio en la práctica clínica. *Química Clínica* 24, 141-148.
- Cavazzuti, M., 2012. Optimization methods: from theory to scientific design and technological aspects in mechanics. Springer, Berlin.
- Chen, X., Yang, G., Chen, J., Chen, X., Wen, Z., Ge, K., 1980. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol. Trace Elem. Res.* 2, 91-107. doi:10.1007/BF02798589
- Cisneros Prego, E., 1995. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas* 14.
- Cisneros Prego, E., Pupo Balboa, J., Céspedes Miranda, E., 1997. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa. *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas* 16, 10-15.
- Combs, G.F., 2001. Selenium in global food systems. *Br. J. Nutr.* doi:10.1079/BJN2000280
- Cornelis, R., Nordberg, M., 2007. General chemistry, sampling, analytical methods, and speciation, en: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L.T. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press, London, pp. 11-38.
- Coultate, T.P., 1997. *Manual de química y bioquímica de los alimentos*, 2da ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Da Silva, E. do N., Baccan, N., Cadore, S., 2013. Determination of selenium, chromium and copper in food dyes by GF AAS. *J. Braz. Chem. Soc.* 24, 1267-1275.
- Daniels, L.A., 1996. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol. Trace Elem. Res.* 54, 185-199. doi:10.1007/BF02784430

- Díaz Huerta, V., Hinojosa Reyes, L., Marchante-Gayón, J.M., Fernández Sánchez, M.L., Sanz-Medel, A., 2003. Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 1243-1247. doi:10.1039/b305827a
- Duntas, L.H., 2009. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. *Horm. Metab. Res.* 41, 443-447. doi:10.1055/s-0029-1220724
- El-Boshy, M.E., Risha, E.F., Abdelhamid, F.M., Mubarak, M.S., Hadda, T. Ben, 2015. Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29, 104-110. doi:10.1016/j.jtemb.2014.05.009
- Fang, Z., 1995. Flow Injection atomic absorption spectrometry. Wiley, Chichester.
- Fang, Z., Tao, G., Xu, S., Liu, X., Wang, J., 1996. New developments in flow injection vapor generation atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.* 53, 42-53.
- FAO, 2012. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura - 2012. FAO, Roma.
- FDA, 1995. Food Labeling: Reference Daily Intakes. *Fed. Regist.* 60, 67164-67175.
- Fennema, O.R., 2000. Química de los alimentos, 2da ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Ferenčík, M., Ebringer, L., 2003. Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system. *Folia Microbiol. (Praha).* 48, 417-426. doi:10.1007/BF02931378
- Finley, J.W., 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutr. Rev.* 64, 146-151. doi:10.1301/nr.2006.mar.146

- Fox, T.E., Van den Heuvel, E.G.H.M., Atherton, C.A., Dainty, J.R., Lewis, D.J., Langford, N.J., Crews, H.M., Luten, J.B., Lorentzen, M., Sieling, F.W., van Aken-Schneyder, P., Hoek, M., Kotterman, M.J.J., van Dael, P., Fairweather-Tait, S.J., 2004. Bioavailability of selenium from fish, yeast and selenate: a comparative study in humans using stable isotopes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58, 343-349. doi:10.1038/sj.ejcn.1601787
- Gammelgaard, B., Rasmussen, L.H., Gabel-Jensen, C., Steffansen, B., 2012. Estimating intestinal absorption of inorganic and organic selenium compounds by in vitro flux and biotransformation studies in Caco-2 cells and ICP-MS detection. *Biol. Trace Elem. Res.* 145, 248-256. doi:10.1007/s12011-011-9174-y
- Goldhaber, S.B., 2003. Trace element risk assessment: Essentiality vs. toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 38, 232-242. doi:10.1016/S0273-2300(02)00020-X
- Gómez, M.M., Gasparic, T., Palacios, M.A., Camara, C., 1998. Determination of five selenium compounds in urine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation-atomic absorption spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 374, 241-251. doi:10.1016/S0003-2670(98)00417-6
- Gómez-Ariza, J.L., Pozas, J.A., Giráldez, I., Morales, E., 1998. Speciation of volatile forms of selenium and inorganic selenium in sediments by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 823, 259-277. doi:10.1016/S0021-9673(98)00581-0
- Gonzalez, W., Chacín, F., García, J., Ascanio, M., Cobo, M., 2006. Bloques incompletos en los diseños de superficie de respuesta compuestos de Box y sus aplicaciones agronómicas. *Rev. la Fac. Agron.* 23, 92-109.
- Grinberg, P., de Campos, R.C., 2001. Iridium as permanent modifier in the determination of lead in whole blood and urine by electrothermal atomic

- absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 56, 1831-1843. doi:10.1016/S0584-8547(01)00162-8
- Gromer, S., Eubel, J.K., Lee, B.L., Jacob, J., 2005. Human selenoproteins at a glance. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2414-2437. doi:10.1007/s00018-005-5143-y
- Harris, D.C., 2006. *Análisis químico cuantitativo*, 3era ed. Reverte, Barcelona, España.
- Hedayat, A.S., Sloane, N.J.A., Stufken, J., 1999. *Orthogonal arrays: theory and applications*, 1.^a ed. Springer, New York. doi:10.1007/978-1-4612-1478-6
- Hegedus, O., Hegedusová, A., Simková, S., Pavlík, V., Jomová, K., 2008. Evaluation of the ET-AAS and HG-AAS methods of selenium determination in vegetables. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 1287-1291. doi:10.1016/j.jprot.2008.01.002
- Hill, K.E., Zhou, J., Austin, L.M., Motley, A.K., Ham, A.J.L., Olson, G.E., Atkins, J.F., Gesteland, R.F., Burk, R.F., 2007. The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for the supply of selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium. *J. Biol. Chem.* 282, 10972-10980. doi:10.1074/jbc.M700436200
- Hoenig, M., Dheere, O., 1995. Evaluation of end-capped tubes for transverse heated graphite atomizer electrothermal atomic absorption spectrometry. *Mikrochim. Acta* 119, 259-264. doi:10.1007/BF01244005
- Högberg, J., Alexander, J., 2007. Selenium, en: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L.T. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press, London, pp. 783-807. doi:10.1016/B978-012369413-3/50093-8
- Holmgren, A., 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264, 13963-13966. doi:10.1016/S0076-6879(02)47028-0

- Holmgren, A., Björnstedt, M., 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 252, 199-208.
- House, J.E., House, K.A., 2010. *Descriptive Inorganic Chemistry*, Second. ed. Academic Press, London.
- House, W.A., Welch, R.M., 1989. Bioavailability of and interactions between zinc and selenium in rats fed wheat grain intrinsically labeled with ^{65}Zn and ^{75}Se . *J. Nutr.* 119, 916-921.
- Hur, S.J., Lim, B.O., Decker, E.A., McClements, D.J., 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chem.* 125, 1-12. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.036
- Institute of Medicine - Food and Nutrition Board, 2000. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. National Academy Press, Washington, DC.
- Jaffé, W., 1992. Selenio, un elemento esencial y tóxico. Datos de Latinoamérica. *Arch. Latinoam. Nutr.* 42, 90-93.
- Johansson, L., Gafvelin, G., Arnér, E.S.J., 2005. Selenocysteine in proteins - Properties and biotechnological use. *Biochim. Biophys. Acta* 1726, 1-13. doi:10.1016/j.bbagen.2005.05.010
- Jun, E.J., Ye, J.S., Hwang, L.S., Kim, Y.K., Lee, H., 2011. Selenium deficiency contributes to the chronic myocarditis in coxsackievirus-infected mice. *Acta Virol.* 55, 23-29. doi:10.4149/av
- Kaur, P., Evje, L., Aschner, M., Syversen, T., 2009. The in vitro effects of selenomethionine on methylmercury-induced neurotoxicity. *Toxicol. Vitro.* 23, 378-385. doi:10.1016/j.tiv.2008.12.024
- Khan, M.A.K., Wang, F., 2009. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understanding of the mercury-

- selenium antagonism. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1567-1577.
doi:10.1897/08-375.1
- King, J.C., 2001. Effect of reproduction on the bioavailability of calcium, zinc and selenium. *J. Nutr.* 131, 1355S-1358S. doi:10.1016/0278-6915(92)90043-K
- Köhrle, J., 2002. Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol.* 347, 125-167.
- Köhrle, J., Gärtner, R., 2009. Selenium and thyroid. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 23, 815-827. doi:10.1016/j.beem.2009.08.002
- Koyama, H., Terada, A., Yoshida, M., Nakada, K., Abdulah, R., Satoh, H., 2007. Cysteine supplementation reduces the bioavailability of selenomethionine in mice. *E. Spen. Eur. E. J. Clin. Nutr. Metab.* 2, 38-43.
doi:10.1016/j.eclnm.2007.01.002
- Kozak, L., Rudnicka, M., Niedzielski, P., 2012. Determination of Inorganic Selenium Species in Dietary Supplements by Hyphenated Analytical System HPLC-HG-AAS. *Food Anal. Methods* 5, 1237-1243. doi:10.1007/s12161-012-9365-y
- Larsen, P.R., Zavacki, A.M., 2012. Role of the iodothyronine deiodinases in the physiology and pathophysiology of thyroid hormone action. *Eur. Thyroid J.* 1, 232-242. doi:10.1159/000343922
- Lavilla, I., González-Costas, J.M., Bendicho, C., 2007. Improved microwave-assisted wet digestion procedures for accurate Se determination in fish and shellfish by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 591, 225-230. doi:10.1016/j.aca.2007.03.075
- Le, K.T., Fotadar, R., 2014. Bioavailability of selenium from different dietary sources in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture* 420-421, 57-62.
doi:10.1016/j.aquaculture.2013.10.034

- Lederer, J., 1986. Sélénium et vitamine E: les deux pompiers de l'organisme. Nauwelaerts, Paris.
- Levander, O.A., Alfthan, G., Arvilommi, H., Gref, C.G., Huttunen, J.K., Kataja, M., Koivistoinen, P., Pikkarainen, J., 1983. Bioavailability of selenium to Finnish men as assessed by platelet glutathione peroxidase activity and other blood parameters. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 887-897.
- Li, X., Yin, D., Yin, J., Chen, Q., Wang, R., 2014. Dietary selenium protect against redox-mediated immune suppression induced by methylmercury exposure. *Food Chem. Toxicol.* 72, 169-177. doi:10.1016/j.fct.2014.07.023
- MAGRAMA, 2015. Base de Datos de Consumo en Hogares [WWW Document]. URL <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/consulta11.asp>
- Martínez Sarrasague, M., Barrado, D.A., Zubillaga, M., Hager, A., de Paoli, T., Boccio, J., 2006. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión: utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Bioquímica Clínica* 40, 45-51.
- McNeal, J.M., Balistrieri, L.S., 1989. Geochemistry and occurrence of selenium: an overview, en: Jacobs, L.W. (Ed.), *Selenium in Agriculture and the Environment*, SSSA Special Publication 23. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 1-13. doi:10.2136/sssaspecpub23.c1
- Miyazaki, K., Watanabe, C., Mori, K., Yoshida, K., Ohtsuka, R., 2005. The effects of gestational arsenic exposure and dietary selenium deficiency on selenium and selenoenzymes in maternal and fetal tissues in mice. *Toxicology* 208, 357-365. doi:10.1016/j.tox.2004.11.030
- Montgomery, D.C., 2005. *Diseño y análisis de experimentos*, 2da ed. Limusa Wiley, México.

- Morales Güeto, J., 2005. Tecnología de los materiales cerámicos. Ediciones Díaz de Santos, Madrid.
- Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Domínguez-González, R., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Bermejo-Barrera, P., 2013a. In vitro bioavailability of total selenium and selenium species from seafood. *Food Chem.* 139, 872-877. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.116
- Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Domínguez-González, R., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Bermejo-Barrera, P., 2013b. ICP-MS for the determination of selenium bioavailability from seafood and effect of major food constituents. *Microchem. J.* 108, 174-179. doi:10.1016/j.microc.2012.10.019
- Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Bermejo-Barrera, P., Prada-Rodríguez, D., 2011. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *Trends Anal. Chem.* 30, 324-345. doi:10.1016/j.trac.2010.09.008
- Moreno-Reyes, R., Suetens, C., Mathieu, F., Begaux, F., Zhu, D., Rivera, M.T., Boelaert, M., Nève, J., Perlmutter, N., Vanderpas, J., 1998. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *N. Engl. J. Med.* 339, 1112-1120. doi:10.1056/NEJM199810153391604
- Nakamura, H., Nakamura, K., Yodoi, J., 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 351-369. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.351
- Näykki, T., Perämäki, P., Kujala, J., Mikkonen, A., 2001. Optimization of a flow injection hydride generation atomic absorption spectrometric method for the

determination of arsenic, antimony and selenium in iron chloride/sulfate-based water treatment chemical. *Anal. Chim. Acta* 439, 229-238. doi:10.1016/S0003-2670(01)01001-7

Nordberg, G.F., Gerhardsson, L., Broberg, K., Mumtaz, M., Ruiz, P., Fowler, B.A., 2007. Interactions in metal toxicology, en: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L.T. (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals*. Academic Press, London, pp. 117-145. doi:10.1016/B978-012369413-3/50062-8

Nuttall, K.L., Allen, F.S., 1984. Selenium detoxification of heavy metals: a possible mechanism for the blood plasma. *Inorganica Chim. Acta* 92, 187-189. doi:10.1016/S0020-1693(00)87757-9

Orozco, A., Valverde-R, C., Olvera, A., García-G, C., 2012. Iodothyronine deiodinases: A functional and evolutionary perspective. *J. Endocrinol.* 215, 207-219. doi:10.1530/JOE-12-0258

Pedrero, Z., Madrid, Y., 2009. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Anal. Chim. Acta* 634, 135-152. doi:10.1016/j.aca.2008.12.026

Pick, D., Degen, C., Leiterer, M., Jahreis, G., Einax, J.W., 2013. Transport of selenium species in Caco-2 cells: Analytical approach employing the ussing chamber technique and HPLC-ICP-MS. *Microchem. J.* 110, 8-14. doi:10.1016/j.microc.2013.02.003

Pieczynska, J., Grajeta, H., 2015. The role of selenium in human conception and pregnancy. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 29, 31-38. doi:10.1016/j.jtemb.2014.07.003

Pilon-Smits, A.A.H., Quinn, C.F., 2010. Selenium metabolism in Plants, en: Hell, R., Mendel, R.-R. (Eds.), *Cell Biology of Metals and Nutrients*. Springer, Berlin, pp. 225-241. doi:10.1007/978-3-642-10613-2

- Pinsent, J., 1954. The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. *Biochem. J.* 57, 10-16.
- Plessi, M., Bertelli, D., Monzani, A., 2001. Mercury and selenium content in selected seafood. *J. Food Compos. Anal.* 14, 461-467. doi:10.006/jfca.2001.1003
- Prat Bartés, A., Tort-Martorell Llabrés, X., Grima Cintas, P., Pozueta Fernández, L., 1997. Métodos estadísticos: control y mejora de la calidad. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España.
- Presser, T.S., Sylvester, M.A., Low, W.H., 1994. Bioaccumulation of selenium from natural geologic sources in western states and its potencial consequences. *Environ. Manage.* 18, 423-436.
- Pyrzyska, K., 2009. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chem.* 114, 1183-1191. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.026
- Raessler, M., Michalke, B., Schulte-Hostede, S., Kettrup, A., 2000. Long-term monitoring of arsenic and selenium species in contaminated groundwaters by HPLC and HG-AAS. *Sci. Total Environ.* 258, 171-181. doi:10.1016/S0048-9697(00)00535-0
- Ralston, N.V.C., Raymond, L.J., 2010. Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology* 278, 112-123. doi:10.1016/j.tox.2010.06.004
- Rayman, M.P., Infante, H.G., Sargent, M., 2008. Food chain selenium and human health: spotlight on speciation. *Br. J. Nutr.* 100, 238-253. doi:10.1017/S0007114508922522
- Rees, K., Hartley, L., Day, C., Flowers, N., Clarke, A., Stranges, S., 2013. Selenium supplementation for the primary prevention of cardiovascular

disease. Cochrane Database Syst. Rev. 1.
doi:10.1002/14651858.CD009671.pub2

Reilly, C., 2006. Selenium in food and health, Second. ed, Selenium in Food and Health. Springer, New York. doi:10.1007/978-0-387-33244-4

Rodríguez García, J.C., Barciela García, J., Herrero Latorre, C., García Martín, S., Peña Crecente, R.M., 2005. Comparison of palladium-magnesium nitrate and ammonium dihydrogenphosphate modifiers for lead determination in honey by electrothermal atomic absorption spectrometry. Food Chem. 91, 435-442. doi:10.1016/j.foodchem.2004.06.024

Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G., 1973. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science (80-.). 179, 588-590. doi:10.1126/science.179.4073.588

Savaskan, N.E., Bräuer, A.U., Kühbacher, M., Eyüpoglu, I.Y., Kyriakopoulos, A., Ninnemann, O., Behne, D., Nitsch, R., 2003. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. FASEB J. 17, 112-114. doi:10.1096/fj.02-0067fje

SCF-Scientific Committee on Food, 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on the tolerable upper intake level of selenium. European Commission, Bruxelles.

Schwarz, K., Foltz, C.M., 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. J. Am. Chem. Soc. 79, 3292-3293. doi:10.1021/ja01569a087

Shaltout, A.A., Castilho, I.N.B., Welz, B., Carasek, E., Gonzaga Martens, I.B., Martens, A., Cozzolino, S.M.F., 2011. Method development and optimization for the determination of selenium in bean and soil samples using hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry. Talanta 85, 1350-1356. doi:10.1016/j.talanta.2011.06.015

- Shrift, A., 1964. A selenium cycle in nature? *Nature* 201, 1304-1305.
- Shriver, D.F., Atkins, P.W., 1999. *Inorganic Chemistry*, Third. ed. Oxford University Press, New York.
- Silva, F.A., Padilha, C.C.F., Rocha de Castro, G., Roldan, P.D.S., de Araujo Nogueira, A.R., Moraes, P.M., Padilha, P.M., 2011. Selenium determination in tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. *Cent. Eur. J. Chem.* 9, 119-125. doi:10.2478/s11532-010-0121-0
- Skoog, D.A., Crouch, S.R., Holler, F.J., 2008. *Principios de analisis instrumental*. Cengage Learning Latin América.
- Spallholz, J.E., Mallory Boylan, L., Rhaman, M.M., 2004. Environmental hypothesis: Is poor dietary selenium intake an underlying factor for arsenicosis and cancer in Bangladesh and West Bengal, India? *Sci. Total Environ.* 323, 21-32. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.09.034
- Stork, A., Jury, W.A., Frankenberger, W.T., 1999. Accelerated volatilization rates of selenium from different soils. *Biol. Trace Elem. Res.* 69, 217-234. doi:10.1007/BF02783874
- Strain, J.J., Cashman, K.D., 2009. Minerals and trace elements, en: Gibney, M.J., Lanhman-New, S.A., Cassidy, A., Vorster, H. (Eds.), *Introduction to Human Nutrition*. John Wiley & Sons, Oxford, pp. 188-237.
- Stranges, S., Laclaustra, M., Ji, C., Cappuccio, F.P., Navas-Acien, A., Ordovas, J.M., Rayman, M., Guallar, E., 2010. Higher selenium status is associated with adverse blood lipid profile in British adults. *J. Nutr. Epidemiol.* 140, 81-87. doi:10.3945/jn.109.111252.81
- Tamari, Y., 1998. Methods of analysis for the determination of selenium in biological, geological, and water samples, en: Frankenberger, W.T., Engberg, R.A. (Eds.), *Environmental chemistry of selenium*. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 27-46.

- Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed. Pharmacother.* 57, 134-144. doi:10.1016/S0753-3322(03)00035-0
- Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y.J., Pussemier, L., 2012. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chem.* 130, 767-784. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.102
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 835-855. doi:10.1351/pac200274050835
- Thomson, C.D., Robinson, M.F., Butler, J.A., Whanger, P.D., 1993. Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in blood components of New Zealand women. *Br. J. Nutr.* 69, 577-588. doi:10.1079/BJN19930057
- Tsalev, D.L., Slaveykova, V.I., Lampugnani, L., D'Ulivo, A., Georgieva, R., 2000. Permanent modification in electrothermal atomic absorption spectrometry - advances, anticipations and reality. *Spectrochim. acta, Part B* 55, 473-490. doi:10.1016/S0584-8547(00)00194-4
- Türker, A.R., Erol, E., 2009. Optimization of selenium determination in chicken's meat and eggs by the hydride-generation atomic absorption spectrometry method. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60, 40-50. doi:10.1080/09637480701589653
- Tyson, J.F., 1999. FIA techniques and strategies expand the potential of atomic spectrometry, en: Sanz-Medel, A. (Ed.), *Flow analysis with atomic spectrometric detectors*. Elsevier, Amsterdam, pp. 64-97. doi:10.1016/S0926-4345(99)80007-8
- Valencia, M.E., Ronayne de Ferrer, P.A., Martín de Portela, M.L.P., 2013. Biodisponibilidad de nutrientes minerales. *Rev. Farm.* 155, 18-35.

- Van Campen, D.R., Glahn, R.P., 1999. Micronutrient bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. *F. Crop. Res.* 60, 93-113. doi:10.1016/S0378-4290(98)00135-X
- Van Dael, P., Lewis, J., Barclay, D., 2004. Stable isotope-enriched selenite and selenate tracers for human metabolic studies: A fast and accurate method for their preparation from elemental selenium and their identification and quantification using hydride generation atomic absorption spectrometry. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 75-80. doi:10.1016/j.jtemb.2004.04.005
- Van der Torre, H.W., Van Dokkum, W., Schaafsma, G., Wedel, M., Ockhuizen, T., 1991. Effect of various levels of selenium in wheat and meat on blood Se status indices and on Se balance in Dutch men. *Br. J. Nutr.* 65, 69-80. doi:10.1079/BJN19910067
- Van Hoewyk, D., 2013. A tale of two toxicities: Malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. *Ann. Bot.* 112, 965-972. doi:10.1093/aob/mct163
- Ventura, M.G., Stibilj, V., Freitas, M.D.C., Pacheco, A.M.G., 2009. Determination of ultratrace levels of selenium in fruit and vegetable samples grown and consumed in Portugal. *Food Chem.* 115, 200-206. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.089
- Villegas Casares, W.A., Acereto Escoffié, P.O., Vargas Quiñones, M.E., 1998. Análisis ultravioleta-visible. La teoría y la práctica en el ejercicio profesional. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México.
- Wang, R.Y., Hsu, Y.L., Chang, L.F., Jiang, S.J., 2007. Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer. *Anal. Chim. Acta* 590, 239-244. doi:10.1016/j.aca.2007.03.045

- Wen, H., Carignan, J., 2007. Reviews on atmospheric selenium: Emissions, speciation and fate. *Atmos. Environ.* 41, 7151-7165. doi:10.1016/j.atmosenv.2007.07.035
- Whanger, P.D., Butler, J.A., 1988. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. *J. Nutr.* 118, 846-852.
- Wu, Y., Zu, K., Warren, M.A., Wallace, P.K., Ip, C., 2006. Delineating the mechanism by which selenium deactivates Akt in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 5, 246-252. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0376
- Xun, P., Hou, N., Daviglus, M., Liu, K., Morris, J.S., Shikany, J.M., Sidney, S., Jacobs, D.R., He, K., 2011. Fish oil, selenium and mercury in relation to incidence of hypertension: A 20-year follow-up study. *J. Intern. Med.* 270, 175-186. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02338.x
- Yang, G., Wang, S., Zhou, R., Sun, S., 1983. Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 872-881.
- Young, V.R., Nahapentian, A., Janghorbani, M., 1982. Selenium bioavailability with reference to human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 1076-1088.
- Żarczyńska, K., Sobiech, P., Radwińska, J., Rękawek, W., 2013. Effects of selenium on animal health. *J. Elemntology* 18, 329-340. doi:10.5601/jelem.2013.18.2.12
- Zeng, H., Botnen, J.H., Johnson, L.A.K., 2008. A selenium-deficient caco-2 cell model for assessing differential incorporation of chemical or food selenium into glutathione peroxidase. *Biol. Trace Elem. Res.* 123, 98-108. doi:10.1007/s12011-008-8097-8
- Zeng, H., Combs, G.F., 2008. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J. Nutr. Biochem.* 19, 1-7. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.02.005

- Zeng, H., Uthus, E.O., Combs, G.F., 2005. Mechanistic aspects of the interaction between selenium and arsenic. *J. Inorg. Biochem.* 99, 1269-1274. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.03.006
- Zhao, Z.-J., Li, Q., Yang, P., Wang, H., Kong, L., Wang, L., Sun, L., 2013. Selenium: a protective factor for Kaschin–Beck Disease in Qing-Tibet Plateau. *Biol. Trace Elem. Res.* 153, 1-4. doi:10.1007/s12011-013-9686-8
- Zhong, L., Arnér, E.S.J., Holmgren, A., 2000. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5854-5859. doi:10.1073/pnas.100114897

IX. OTRAS PUBLICACIONES



P36.- CONTENIDO DE SELENIO EN PRODUCTOS PESQUEROS AMPLIAMENTE CONSUMIDOS EN ESPAÑA

Fernando Cámara-Martos¹, Jean Marval-León¹,
Manuel Ángel Amaro-López¹, Rafael Moreno-Rojas¹

¹ Dpto. Bromatología y Tecnología de Alimentos. Edificio C1. Universidad de Córdoba.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El pescado y los productos marinos son componentes esenciales de la dieta mediterránea. En España, el consumo per cápita de este tipo de productos alcanzó en el año 2009 los 27.6 Kg. Este consumo de pescado es especialmente beneficioso para la salud debido a su alto contenido en proteínas de gran valor nutricional, ácidos grasos ω -3, vitamina D y minerales antioxidantes como el selenio, un micronutriente esencial para el ser humano, ya que forma parte del centro activo de la glutatión peroxidasa, enzima que protege a las membranas celulares de daños oxidativos

MATERIAL Y METODOS

20 muestras de pescado y marisco ampliamente consumidas en España fueron seleccionadas para la determinación de su contenido en selenio mediante una técnica combinada de espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros con cámara de grafito (HG-ET-AAS). Previamente las muestras fueron sometidas a un proceso de liofilización y posterior digestión por vía húmeda

RESULTADOS

Las especies de pescado azul como caballa y atún presentaron los más altos contenidos en selenio con 0.638 y 0.523 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. También, las especies de marisco (berberecho, chirla, gamba, langostino y mejillón) presentaron contenidos relativamente altos (0.424 – 0.366 $\mu\text{g g}^{-1}$) lo cual es consistente con otros estudios. Por contra las especies de pescado blanco (bacalao, dorada, lenguado, lubina, pescadilla, rape y rodaballo) presentaron un contenido en selenio significativamente más bajo ($p = 0.025$) que las especies de pescado azul. Finalmente, los peces de agua dulce mostraron los más bajos contenidos en selenio con 0.112, 0.081 y 0.052 $\mu\text{g g}^{-1}$ para trucha, salmón y panga respectivamente. Probablemente el efecto concentrador en determinados micronutrientes que realizan algunos tipos de algas y plancton presentes en los océanos pueda ser la causa de un contenido más bajo de selenio en los peces de lagos y ríos.

CONCLUSIONES

Las especies de pescado azul y de marisco resultan una excelente fuente de selenio. La ingesta de 100 g de este tipo de productos cubriría prácticamente el 100% de la RDA (55 $\mu\text{g/día}$) para este elemento. Además de satisfacer los requerimientos fisiológicos para este micronutriente esencial, el consumo de pescado tiene otros efectos beneficiosos para la salud debido a su contenido en grasa y proteínas siendo un componente esencial de la dieta de los países mediterráneos cuyo consumo debe potenciarse.

Tipo Comunicación: POSTER



P44.- BIOACCESIBILIDAD DE SELENIO EN PRODUCTOS PESQUEROS: INFLUENCIA DE LAS PROTEÍNAS, GRASA Y METALES PESADOS

Fernando Cámara-Martos¹, Jean Marval-León¹, Ana Ramírez-Ojeda¹,
Manuel Angel Amaro-López¹, Rafael Moreno-Rojas¹

¹ Dpto. Bromatología y Tecnología de Alimentos. Universidad de Córdoba.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La bioaccesibilidad puede definirse como la fracción de micronutriente, originalmente presente en un alimento, que es capaz de ser digerida y absorbida en el lumen intestinal. Este concepto parte de la idea de que sólo esta fracción será posteriormente susceptible de ser efectivamente utilizada por el organismo y transformada en una forma bioquímicamente activa. El pescado es un componente habitual de la dieta mediterránea y un alimento con un contenido en Se relativamente alto. Sin embargo esto no implica necesariamente una elevada bioaccesibilidad en este elemento esencial, necesario para el funcionamiento de determinadas enzimas como glutatión peroxidasa, desyodasas y selenoproteínas

MATERIAL Y METODOS

Para la determinación de la bioaccesibilidad de Se seleccionamos 20 muestras de productos pesqueros ampliamente consumidos en España. Sobre cada una de estas muestras se realizó una digestión gastrointestinal simulada compuesta de una etapa gástrica (pepsina+HCl) durante 2 horas y una etapa intestinal (pancreatina+sales biliares+HCO₃) durante 2 horas más. Terminado este proceso de digestión se determinó la fracción de Se soluble presente en el sobrenadante tras someter el digerido a un proceso de centrifugación a 4000 rpm, 4°C durante 1 hora (fracción soluble) ó la fracción de Se que dializa a través de una membrana semipermeable con un determinado tamaño de poro (12000 Å) introduciendo previamente dicha membrana en el digerido durante la etapa intestinal (fracción dializable). La determinación del contenido en Se soluble y dializable se llevo a cabo mediante una técnica combinada de espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros con cámara de grafito (HG-ET-AAS). También se determinaron el contenido en proteínas, grasa y metales pesados como Cd para estudiar su posible influencia en la bioaccesibilidad

RESULTADOS

Las especies con un mayor contenido en Se bioaccesible fueron las especies de pescado azul, como caballa (0.410 y 0.069 µg/g para Se soluble y dializable respectivamente) y atún (0.263 µg/g de Se soluble) probablemente porque también fueron las especies que presentaron un mayor contenido de Se total. De hecho se observa una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.01$) para Se total y Se soluble y dializable lo cual es justificable si se tiene en cuenta que un mayor contenido inicialmente presente en el pescado implicara una mayor cantidad de Se soluble o dializable

Por otro lado no se encuentra una correlación estadísticamente significativa entre contenido en Se total y contenido en proteínas a pesar de que una forma habitual de presentarse el Se en los alimentos proteicos es en forma orgánica, principalmente unido a aminoácidos como selenocisteína y selenometionina. Sí se observa sin embargo una correlación entre Se dializable y contenido graso ($p < 0.05$) que pone de manifiesto una menor dializabilidad de Se al aumentar el contenido graso del pescado

En relación a los metales pesados aunque sólo se detectaron niveles de Cd en las especies de marisco y moluscos como berberecho, calamar, chirla, mejillón y gamba, se observa una correlación negativa ($p < 0.05$) entre este metal pesado y el contenido en Se de las muestras así como una tendencia a disminuir la solubilidad y dializabilidad de Se al aumentar el contenido en Cd



CONCLUSIONES

Las especies de pescado azul como caballa y atún resultan una excelente fuente de Se bioaccesible. La presencia de metales pesados como Cd disminuye el contenido en Se de las muestras en las que se encuentra presente así como su bioaccesibilidad. Hay evidencias de que Se forma seleniuros con metales como Cd, Hg y As que son muy insolubles lo que contribuye a mantener estos metales biológicamente no disponibles aunque paralelamente disminuya la bioaccesibilidad de este elemento traza

Tipo Comunicación: POSTER

XXIII REUNIÓN NACIONAL – VI CONGRESSO IBÉRICO
ESPECTROSCOPIA
CÓRDOBA 2012 (XXIII RNE – VI CIE)



D. ANTONIO SOLA DÍAZ, Presidente del Comité Organizador de la XXIII Reunión Nacional de Espectroscopía – VII Congresso Ibérico de Espectroscopía, celebrado en Córdoba los días 17 al 20 de Septiembre de 2012

CERTIFICA

que la contribución

Determinación de selenio total y bioaccesible en muestras de pescado mediante combinación de espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros con cámara de grafito (HG-ET-AAS)

Jean Marval, Fernando Cámara, Manuel Ángel Amaro y Rafael Moreno

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Darwin C-1, 14040 Córdoba, e-mail: jeanmarval@gmail.com

ha sido presentada en forma de: póster
en dicho congreso.

En Córdoba, a 20 de Septiembre de 2012.

Fdo. Antonio Sola Díaz

Presidente del Comité Organizador de la XXIII RNE – VII CIE